



**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK KAYU SECANG  
(*Caesalpinia sappan* L.) MENGGUNAKAN METODE INHIBISI  
ENZIM  $\alpha$ -AMILASE SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Amirun Nisaul Maghfiroh**

**NIM 162210101104**

**BAGIAN FARMASI KLINIK DAN KOMUNITAS**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK KAYU SECANG  
(*Caesalpinia sappan* L.) MENGGUNAKAN METODE INHIBISI ENZIM  $\alpha$ -  
AMILASE SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi  
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

**Amirun Nisaul Maghfiroh**

**NIM 162210101104**

**BAGIAN FARMASI KLINIK DAN KOMUNITAS**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada hamba-Nya yang selalu berjuang dalam kebaikan dan menuntut ilmu;
2. Ayah Amir Fatah dan Ibu Sulilik Handayani yang telah membesarkan, mendidik dan membimbing dengan kasih sayang, cinta, doa, kesabaran, kerja keras, motivasi, nasihat dan segalanya kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
3. Adik Alexandria Amir Zulkarnain dan Adik Amir Shihab Firdaus, Mbak Azka Milal tersayang yang selalu membuat penulis termotivasi;
4. Keluarga besar Haji Munif dan Sunjamin;
5. Guru-guru penulis di “SDN Gunongsekar 1 Sampang , SMPN 2 Sampang dan SMAN 1 Sampang”, dosen, laboran dan segenap civitas akademika Universitas Jember khususnya Fakultas Farmasi, yang telah membimbing dan memberikan ilmu pengetahuannya kepada penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan;
6. Teman-teman seperjuangan Farmasi angkatan 2016 “MORFIN”;
7. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTO**

“Bertaqwalah kepada Allah, maka Dia akan membimbingmu. Sesungguhnya Allah mengetahui segala sesuatu”  
(Qs. Al Baqarah: 282)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Amirun Nisaul Maghfiroh

NIM : 162210101104

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Menggunakan Metode Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Amilase Secara In Vitro adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 April 2020

Yang menyatakan,

Amirun Nisaul Maghfiroh

162210101104

**SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK KAYU SECANG  
(*Caesalpinia sappan* L.) SECARA IN VITRO MENGGUNAKAN METODE  
INHIBISI ENZIM  $\alpha$ -AMILASE**

Oleh:

Amirun Nisaul Maghfiroh

NIM 162210101104

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Ika Puspita Dewi, S.Farm., M.Biomed., Apt.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Secara In vitro Dengan Metode Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Amilase” karya Amirun Nisaul Maghfiroh telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 16 Juli 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

**Tim Pembimbing**

Dosen Pembimbing Utama,

apt. Diana Holiday, S.F., M.Farm.  
NIP. 197812212005012002

Dosen Pembimbing Anggota,

apt. Ika Puspita Dewi, S.Farm., M.Biomed.  
NIP. 198406132008122001

**Tim Penguji**

Dosen Penguji I

apt. Fransiska Maria C. S.Farm, M.Farm.  
NIP.198404062009122008

Dosen Penguji II

apt. Ema Rachmawati S.Farm., M.Farm.  
NIP.198403082008012003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

apt. Lesty Wulandari, S.Si., M.Farm.

NIP. 197604142002122001

## RINGKASAN

**Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Secara *In vitro* Dengan Metode Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Amilase:** Amirun Nisaul Maghfiroh: 162210101104; 2018; 91 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme yang dikarakteristikan dengan resistensi terhadap aksi insulin, sekresi insulin tidak mencukupi, atau keduanya. Jumlah penderita diabetes terus meningkat tiap tahunnya. Pada penderita DM terjadi peningkatan regulasi enzim dan transporter glukosa, termasuk enzim  $\alpha$ -amilase juga mengalami peningkatan jumlah dan aktivitas. Faktor ini berkontribusi terhadap kondisi gangguan toleransi glukosa. Golongan DM yang umum diderita yaitu DM tipe 2, perkembangan DM tipe 2 dapat diketahui melalui hiperglikemia postprandial yaitu kadar glukosa darah setelah makan. Salah satu terapi penting untuk menekan hiperglikemia postprandial adalah perlambatan pencernaan dan absorpsi karbohidrat melalui penghambatan enzim pencerna karbohidrat seperti  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Meningkatnya kesadaran masyarakat mengenai gaya hidup *back to nature*, memicu masyarakat untuk memanfaatkan bahan tanaman sebagai alternatif pengobatan khususnya dalam masalah diabetes. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan*). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menentukan pengaruh pemberian ekstrak kayu secang terhadap aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*, dengan membandingkan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari kontrol positif (akarbose), kontrol negatif, dan ekstrak kayu secang. Tahap pertama yaitu ekstraksi kayu secang dengan metode maserasi, kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa kimia dalam ekstrak, setelah itu dilanjutkan uji aktivitas penghambatan ekstrak terhadap enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan metode spektrofotometri. Metode ini dilakukan dengan penentuan total gula reduksi yang terbentuk dengan penambahan 3,5-dinitrosalisilat (DNS), lalu dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 540 nm. Masing-masing penelitian dilakukan 3 kali replikasi. Semakin kecil absorbansi, maka penghambatannya semakin besar, menandakan semakin baik potensinya sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase. Parameter penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase ditetapkan menggunakan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*), nilai  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai konsentrasi ekstrak, yang mengandung inhibitor  $\alpha$ -amilase yang menghambat 50% aktivitas  $\alpha$ -amilase dalam kondisi pengujian.

Hasil penelitian menunjukkan nilai  $IC_{50}$  akarbose sebesar  $43,510 \mu\text{g/ml} \pm 0,224$ , sedangkan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak kayu secang yaitu sebesar  $763,174 \mu\text{g/ml} \pm 16,830$ . Data  $IC_{50}$  dianalisis menggunakan Uji T tidak berpasangan untuk mengetahui perbedaan nilai  $IC_{50}$  akarbose dengan ekstrak kayu secang, didapatkan nilai  $p < 0,001$  yang menunjukkan perbedaan signifikan antara akarbose dan ekstrak kayu secang dalam menghambat enzim  $\alpha$ -amilase. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$



yang didapatkan menunjukkan bahwa potensi akarbose sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase tergolong sangat kuat, sedangkan potensi ekstrak tergolong sangat lemah. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak kayu secang lebih lemah dibandingkan kontrol positif akarbose.



## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: “Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Secara In vitro Dengan Metode Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Amilase”. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa atas semua karunia yang telah diberikan;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
3. Ibu Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Ibu Ika Puspita Dewi., S.Farm., M. Biomed., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga serta perhatiannya untuk memberikan ilmu, bimbingan, dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
4. Ibu Fransiska Maria C., S.Farm., Apt., M.Farm dan Ibu Ema Rachmawati S.farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Ibu Fransiska Maria C., S.Farm., Apt., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan selama masa perkuliahan;
6. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan bimbingan kepada penulis selama menempuh studi;
7. Ayah Amir Fatah, Ibu Sulilik, Adik Andre dan Ferdi, serta seluruh keluarga besar Haji Munif dan Sunjamin, atas do'a, motivasi dan kasih sayang yang diberikan;
8. Mbak Dinik dan Mbak Indri selaku Teknisi Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang banyak membantu penelitian ini;
9. Tim FIMES (Finola, Monika, Sabda) terima kasih telah memberikan dukungan

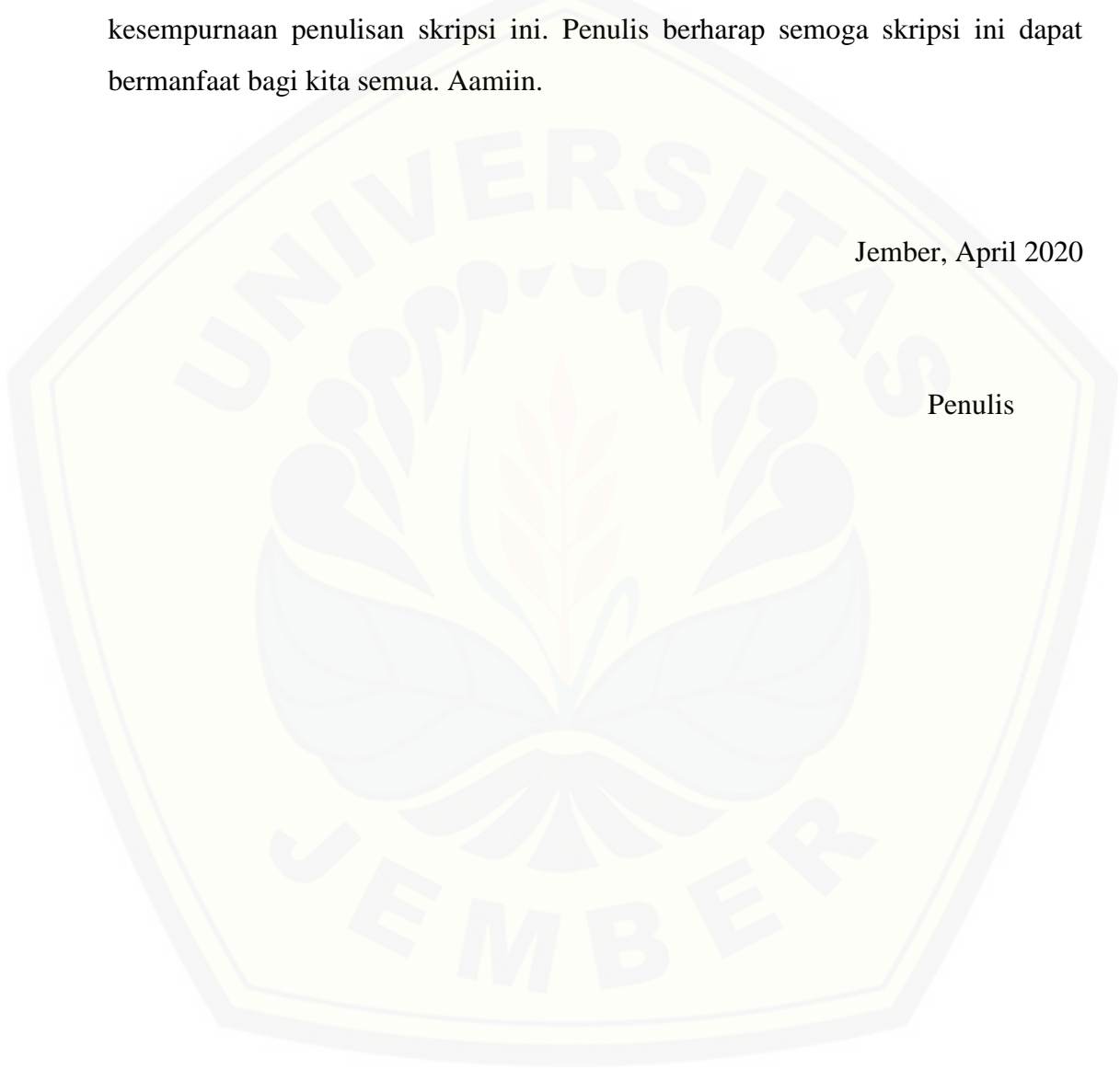
serta kerjasama terbaik dalam penelitian ini.

10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung atas bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Aamiin.

Jember, April 2020

Penulis



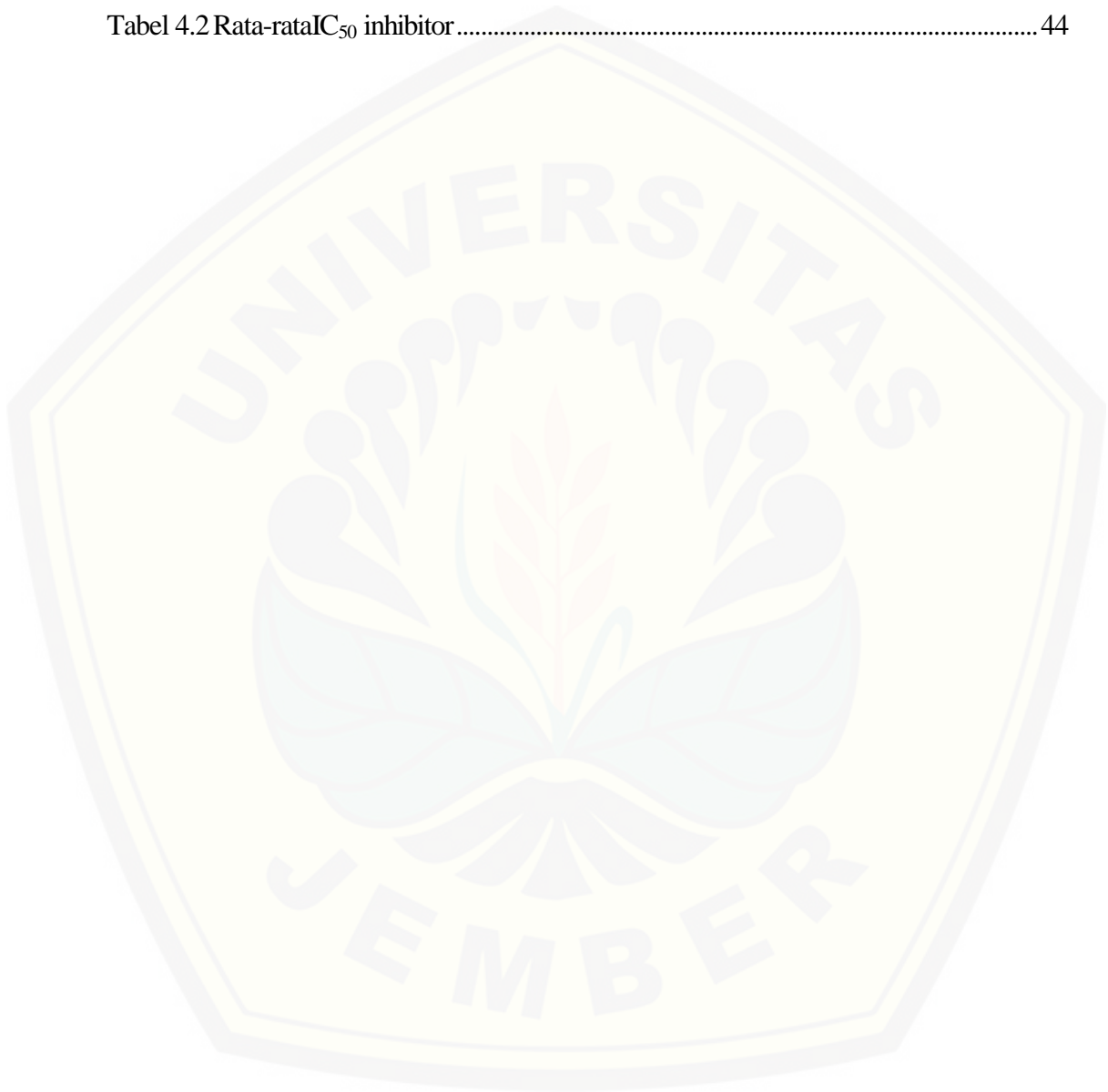
**DAFTAR ISI**

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xxiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Tentang Diabetes Melitus .....	6
2.1.1 Definisi dan Patofisiologis Diabetes Melitus .....	6
2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus .....	6
2.1.3 Gejala dan Komplikasi Diabetes Melitus .....	8
2.1.4 Diagnosis Diabetes Melitus .....	8
2.1.5 Tinjauan Tentang Terapi Diabetes Melitus .....	9
2.2 Digesti dan Absorpsi Karbohidrat .....	13
2.3 Enzim $\alpha$ -Amilase .....	16
2.4 Inhibitor Enzim $\alpha$ -Amilase .....	18
2.5 Akarbose .....	20
2.6 Uji Penghambatan Enzim $\alpha$ -Amilase .....	21
2.7 Tinjauan Tentang Tanaman Secang.....	23
2.7.1 Klasifikasi Tanaman Secang .....	23
2.7.2 Deskripsi dan Morfologi Tanaman Secang .....	23

2.7.3	Kandungan dan Manfaat Kayu Secang .....	25
2.8	Penelitian Lain tentang Inhibitor Enzim $\alpha$ -Amilase .....	26
2.9	Skrining Fitokimia .....	28
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN .....	29
3.1	Jenis Penelitian .....	29
3.2	Judul Subbab Bab 3 .....	29
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.4	Definisi Operasional .....	29
3.5	Bahan dan Alat Penelitian .....	30
3.5.1	Bahan-bahan Penelitian .....	30
3.5.2	Alat-alat Penelitian .....	30
3.6	Prosedur Penelitian .....	30
3.6.1	Penyiapan Simplisia .....	30
3.6.2	Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang.....	30
3.6.3	Skrining Fitokimia.....	31
3.6.4	Penyiapan Larutan Pereaksi .....	29
3.6.5	Uji Aktivitas Inhibisi Enzim $\alpha$ -Amilase.....	29
3.6.6	Skema Rancangan Penelitian .....	37
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	39
	4.1 Hasil	39
4.1.1	Ekstraksi Kayu Secang	39
4.1.2	Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	39
4.1.3	Uji aktivitas penghambatan enzim $\alpha$ -amilase .....	43
4.2	Pembahasan .....	43
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN .....	47
	DAFTAR PUSTAKA .....	48
	LAMPIRAN.....	56

**DAFTAR TABEL**

Tabel 3.1 Sistem reaksi pengujian enzim $\alpha$ -Amilase.....	37
Tabel 4.1 Hasil skrining fitokimia ekstrak kayu secang .....	41
Tabel 4.2 Rata-rata $IC_{50}$ inhibitor.....	44



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Polimer glukosa pada pati .....	14
Gambar 2.2 Mekanisme absorpsi glukosa di usus halus.....	16
Gambar 2.3 Struktur enzim $\alpha$ -Amilase .....	18
Gambar 2.4 Formula struktur Akarbose.....	14
Gambar 2.5 Tahapan reaksi reduksi DNS .....	22
Gambar 2.6 Kayu Secang.....	24
Gambar 2.7 Stuktur Brazilin, <i>Sappanchalcone</i> , Protosappanin B, dan Protosappanin C .....	26
Gambar 2.8 Struktur flavonoid.....	27
Gambar 2.9 Prediksi ikatan flavonoid.....	29
Gambar 4.1 Kurva konsentrasi sampel vs % inhibisi akarbose .....	42
Gambar 4.2 Kurva konsentrasi sampel vs % inhibisi ekstrak kayu secang .....	42
Gambar 4.3 Data IC <sub>50</sub> akarbose.....	43
Gambar 4.4 Data IC <sub>50</sub> ekstrak kayu secang .....	43

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah gangguan metabolisme kronis yang ditandai oleh hiperglikemia dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein sebagai akibat dari resistensi terhadap aksi insulin, sekresi insulin tidak mencukupi, atau keduanya (Dipiro dkk., 2015). Secara umum diabetes melitus diklasifikasikan menjadi empat tipe, yaitu DM tipe 1, DM tipe 2, DM gestasional, dan DM spesifik lain. DM tipe 1 disebabkan oleh kekurangan insulin secara absolut karena adanya kerusakan sel  $\beta$ -pankreas akibat autoimun. DM tipe 2 diakibatkan oleh defisiensi insulin secara progresif karena disfungsi sel  $\beta$ -pankreas dan resistensi insulin. DM tipe gestasional disebabkan oleh gangguan hormonal pada wanita hamil. DM spesifik tipe lain disebabkan oleh adanya kelainan genetik, gangguan endokrin, gangguan eksokrin pankreas, infeksi, dan senyawa kimia atau obat (ADA, 2019).

Jumlah penderita DM terus meningkat, pada tahun 2017 penderita DM di seluruh dunia dengan usia 20 sampai 79 tahun berjumlah 425 juta orang dan diperkirakan akan meningkat menjadi 629 juta orang pada tahun 2045. Angka kematian akibat komplikasi diabetes di seluruh dunia pada tahun 2017 diperkirakan sebanyak 4 juta orang. Pada tahun 2017, Indonesia menduduki posisi ke-6 setelah Cina, India, Amerika, Brazil, dan Mexico dengan jumlah penderita diabetes usia 20 sampai 79 tahun sebanyak 10,3 juta jiwa dan pada tahun 2045 diperkirakan meningkat menjadi 16,7 juta jiwa (IDF, 2017). Menurut Riskesdas 2018, pada tahun 2013 prevalensi DM di Indonesia sebesar 6,9 % dan pada tahun 2018 meningkat menjadi 8,5 % (KemenKes RI, 2018).

DM diakibatkan karena pankreas tidak memproduksi cukup insulin sebagai akibat dari disfungsi atau kerusakan sel  $\beta$  pankreas, atau tubuh tidak efektif dalam menggunakan insulin yang diproduksi. Kondisi ini mengakibatkan pengambilan glukosa oleh sel target akan berkurang sehingga kadar glukosa dalam darah akan meningkat (Suharti dkk., 2016). Penderita DM juga mengalami



peningkatan regulasi enzim dan transporter glukosa, termasuk enzim  $\alpha$ -amilase juga mengalami peningkatan jumlah dan aktivitas. Peningkatan regulasi enzim dan transporter glukosa berkontribusi terhadap kondisi gangguan toleransi glukosa (Williamson, 2013). Hiperglikemia adalah faktor utama yang berperan dalam patogenesis komplikasi diabetes (Marcovecchio dkk., 2011). Komplikasi kronis diabetes diantaranya adalah komplikasi mikrovaskular meliputi nefropati, neuropati dan retinopati, sedangkan komplikasi makrovaskular meliputi gangguan pada kardiovaskular dan serebrovaskular (Forbes dan Cooper, 2013).

Tujuan akhir penatalaksanaan DM adalah untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas DM. Komponen utama dalam pendekatan terapi pada pasien diabetes adalah pengaturan nutrisi, olahraga, dan farmakoterapi dengan obat hipoglikemik oral, injeksi insulin, dan injeksi antidiabetes yang lain. Penderita diabetes melitus tipe 1 harus diterapi dengan insulin, sedangkan untuk diabetes melitus tipe 2 terapi utamanya adalah obat hipoglikemik oral, namun juga membutuhkan terapi insulin apabila kadar glukosa darah tetap tidak terkontrol dengan terapi lain (Dipiro dkk., 2015; AACE, 2019).

Golongan DM yang umum diderita adalah DM tipe 2 (WHO, 2019). Pada DM tipe 2, hiperglikemia *postprandial* berperan penting dalam perkembangan penyakit. Pendekatan terapi untuk DM tipe 2 salah satunya dengan menekan hiperglikemia *postprandial* melalui penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Chigurupati dkk., 2019). Enzim  $\alpha$ -amilase berfungsi untuk menghidrolisis ikatan glikosidik ( $\alpha$ -1,4) dari polisakarida dan mengubahnya menjadi oligosakarida atau disakarida, kemudian enzim  $\alpha$ -glukosidase menghidrolisis oligosakarida atau disakarida menjadi glukosa dan monosakarida lainnya yang kemudian tersedia untuk diabsorpsi (Dashty, 2013). Penghambatan kerja kedua enzim tersebut efektif dalam memperlambat digesti karbohidrat dan absorpsinya dari usus halus, sehingga menghasilkan efek antihiperglikemi *postprandial* (Dinicolantonio dkk., 2015).

Salah satu obat hipoglikemik oral adalah inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase. Inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase yang disetujui FDA adalah miglitol dan akarbose (Gourgari dkk., 2017). Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang paling banyak digunakan

adalah akarbose. Akarbose berperan dalam menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase di dinding usus halus dan juga dapat menghambat enzim  $\alpha$ -amilase pankreas (Kalra, 2014). Efek samping penggunaan akarbose diantaranya adalah gangguan gastrointestinal, mual, diare, lebih banyak flatus, dan peningkatan transaminase (Koda-Kimble dkk., 2013). Alternatif terapi obat yang dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan lebih sedikit efek samping terus dikembangkan, salah satunya dengan memanfaatkan bahan tanaman.

Kayu secang (*Caesalpinia sappan*) adalah salah satu tumbuhan yang memiliki aktivitas sebagai antidiabetes. Penelitian yang dilakukan oleh Huda (2019) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dosis 100 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah setara dengan kelompok kontrol positif glibenklamid 0,9 mg/kgBB. Ekstrak kayu secang mengandung flavonoid sebesar  $9,588 \pm 2,198$  mg QE/g sampel dan fenol total ekivalen epigalokatekin (EGC) sebesar 849,11  $\mu$ g/mg dan ekivalen epikatekin galat (ECG) sebesar 825,11  $\mu$ g/mg (Widowati, 2011; Muhammadiyah, 2019). Senyawa fenolik utama yang terkandung pada kayu secang adalah brazilin, *chalcone*, protosappanin dan homisoflavonoid (Fu dkk., 2008).

Brazilin, *sappanchalcone*, protosappanin B dan protosappanin C dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan*) memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase, selain itu *sappanchalcone* juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase (Arsiningtyas, 2015). Brazilin, *sappanchalcone*, protosappanin B dan protosappanin C adalah senyawa fenolik golongan flavonoid. Senyawa golongan flavonoid memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase melalui pembentukan ikatan hidrogen membentuk sistem  $\pi$ -terkonjugasi dengan situs aktif enzim (Takahama dan Hirota, 2018). Salah satu metode uji penghambatan  $\alpha$ -amilase adalah metode *dinitrosalicylic acid* (DNS). Prinsip dari metode ini adalah pengukuran gula reduksi hasil reaksi hidrolisis pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase yang kemudian dianalisis dengan metode spektrofotometri (Nugraha dan Hasanah, 2018).

Penelitian aktivitas penghambatan ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim  $\alpha$ -amilase belum dilakukan. Penelitian ini dilakukan

untuk uji aktivitas penghambatan ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan perbandingan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan akkarbose. Selain itu, skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah kandungan senyawa kimia dalam ekstrak kayu secang ?
2. Bagaimana aktivitas penghambatan (IC50) ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim  $\alpha$ -amilase?
3. Bagaimana perbandingan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan akkarbose?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini, antara lain :

1. Menentukan kandungan senyawa kimia dalam ekstrak kayu secang.
2. Menentukan aktivitas penghambatan (IC50) ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim  $\alpha$ -amilase.
3. Menentukan perbandingan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan akkarbose.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, antara lain :

1. Memberi informasi ilmiah mengenai kandungan senyawa kimia dalam ekstrak kayu secang.
2. Memberi informasi ilmiah mengenai aktivitas penghambatan (IC50) ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim  $\alpha$ -amilase.

3. Memberi informasi ilmiah mengenai perbandingan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan akardose.
4. Memberi informasi yang dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tentang Diabetes Melitus

#### 2.1.1 Definisi dan Patofisiologis Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) adalah gangguan metabolisme kronis yang ditandai oleh hiperglikemia dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein sebagai akibat dari resistensi terhadap aksi insulin, sekresi insulin tidak mencukupi, atau keduanya (Dipiro dkk., 2015). Insulin adalah hormon yang diproduksi oleh sel beta pankreas sebagai respon terhadap meningkatnya kadar glukosa dalam darah. Insulin kemudian akan berikatan dengan reseptornya di sel otot, sel hati, dan adiposa menyebabkan *uptake* glukosa ke dalam jaringan-jaringan ini. Kurangnya insulin atau ketidakmampuan sel untuk merespons insulin menyebabkan glukosa tetap berada dalam darah sehingga sel memperoleh energi terutama dari metabolisme protein dan lemak (Suharti dkk., 2016). Hiperglikemia dapat menyebabkan timbulnya berbagai gejala DM dan pada jangka waktu yang panjang dapat menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah dan memicu berbagai komplikasi DM (Moini, 2019).

#### 2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus

Menurut ADA (2019) diabetes melitus diklasifikasikan secara umum menjadi 4 tipe, antara lain :

##### a. Diabetes melitus tipe 1

DM tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun karena sistem imun tubuh menyerang sel beta pankreas, sehingga terjadi defisiensi insulin absolut. DM tipe 1 lebih sering terjadi pada anak-anak dan remaja, namun juga dapat terjadi pada umur berapapun (Dipiro dkk., 2015). Terapi insulin dibutuhkan untuk mempertahankan kadar glukosa darah normal pada penderita DM tipe 1. Penderita DM tipe 1 mencapai sekitar 5%-10% dari keseluruhan penderita DM yang telah terdiagnosis (ADA, 2019).

b. Diabetes melitus tipe 2

Hiperglikemia pada DM tipe 2 diakibatkan karena produksi insulin yang tidak memadai atau ketidakmampuan tubuh untuk merespons sepenuhnya terhadap insulin yang didefinisikan sebagai resistensi insulin. Pada keadaan resistensi insulin, insulin tidak dapat bekerja secara optimal di sel target sehingga pankreas mengkompensasi dengan meningkatkan produksi insulin. Ketika sel beta pankreas menghasilkan insulin secara tidak adekuat untuk mengimbangi terjadinya resistensi insulin, maka akan terjadi hiperglikemia kronik (Decroli, 2019). Resiko terjadinya komplikasi makrovaskular dan mikrovaskular menjadi lebih tinggi pada penderita diabetes tipe 2 (Dipiro dkk., 2015). DM tipe 2 berhubungan dengan kurang aktivitas, obesitas serta bertambahnya usia yang menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Terapi utama DM tipe 2 adalah obat antidiabetes oral (Soelistijo dkk., 2015). Terapi insulin juga dibutuhkan pada penderita DM Tipe 2 jika dengan pemberian terapi lain tidak mencapai target terapi yaitu hemoglobin A1C  $\leq 6.5\%$  untuk pasien tanpa penyakit serius dan resiko hipoglikemik rendah (AAACE, 2019). Penderita diabetes melitus tipe 2 mencapai 90%-95% dari keseluruhan penderita diabetes (ADA, 2019).

c. Diabetes melitus gestasional

DM gestasional atau *Gestational Diabetes Mellitus* (GDM) didefinisikan sebagai suatu kondisi tingginya kadar glukosa darah selama kehamilan yang terjadi pada trimester kedua dan ketiga kehamilan. Pada kehamilan terjadi perubahan hormon yang menyebabkan terjadinya resistensi insulin, dan DM gestasional dapat terjadi jika ibu hamil tidak mampu mengkompensasi kondisi tersebut dengan peningkatan produksi insulin agar tetap dalam kondisi normoglikemia (Dipiro dkk., 2015). Wanita hamil dengan kondisi GDM memiliki resiko terjadinya DM tipe 2 dalam 5-10 tahun mendatang. DM gestasional juga meningkatkan resiko obesitas dan DM tipe 2 pada bayi (ADA, 2019).

d. Diabetes melitus spesifik lain

DM spesifik lain diakibatkan karena penyebab selain tipe 1, tipe 2 dan GDM, misalnya kelainan genetik pada fungsi sel  $\beta$  dan aksi insulin, gangguan pada kelenjar eksokrin pankreas (misalnya fibrosis sistik dan pankreatitis),

gangguan kelenjar endokrin (ekresi berlebih hormon yang merupakan antagonis insulin) dan zat kimia atau obat-obatan yang menginduksi terjadinya diabetes (misalnya glukokortikoid dan terapi pada HIV/AIDS), dan infeksi (rubella, Coxsackie B dan virus seperti *cytomegalovirus* dan adenovirus) (Baynest, 2015; Tripathi dan Saboo, 2019).

### 2.1.3 Gejala dan Komplikasi Diabetes Melitus

Diabetes dapat muncul dengan gejala khas berupa polifagia (mudah lapar), poliuria (sering buang air kecil), polidipsia (sering haus), pandangan kabur, penurunan berat badan, kurang energi, penyembuhan luka lambat, infeksi jamur pada genital, dan mati rasa di tangan atau kaki. Manifestasi klinis paling parah adalah ketoasidosis atau keadaan hiperosmolar non-ketotik yang dapat menyebabkan dehidrasi, koma dan kematian (IDF, 2017). Sebagian besar gejala pada DM tipe 1 dan tipe 2 serupa tetapi bervariasi dalam derajat, berkembang lebih cepat dan lebih khas pada DM tipe 1 (Baynest, 2015).

Hiperglikemia adalah faktor utama yang berperan dalam patogenesis komplikasi diabetes melalui beberapa mekanisme, diantaranya: glikosilasi nonenzimatik protein dan lipid, aktivasi protein kinase C, peningkatan fluks melalui jalur heksosamin, peningkatan stres oksidatif, dan inflamasi (Marcovecchio dkk., 2011). Komplikasi diabetes dapat dibagi menjadi dua, yaitu komplikasi akut dan kronis. Komplikasi akut termasuk hipoglikemia, keadaan hiperglikemia hiperosmolar, ketoasidosis diabetikum, koma, kejang atau kehilangan kesadaran dan infeksi. Komplikasi mikrovaskular kronis meliputi nefropati, neuropati dan retinopati, sedangkan komplikasi makrovaskular kronis meliputi gangguan pada kardiovaskular dan serebrovaskular (Forbes dan Cooper, 2013).

#### 2.1.4 Diagnosis Diabetes Melitus

Empat tes diagnostik untuk diabetes yang direkomendasikan saat ini adalah kadar glukosa plasma puasa, glukosa plasma dua jam setelah makan setelah tes toleransi glukosa oral (TTGO) 75 g, kadar HbA1c dan glukosa darah acak jika terdapat tanda dan gejala diabetes. Individu dengan nilai glukosa plasma puasa  $\geq 7,0$  mmol/L (126 mg/dl), glukosa plasma dua jam setelah makan  $\geq 11,1$  mmol/L (200 mg/dl), HbA1c  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol); atau glukosa darah acak  $\geq 11,1$  mmol/L (200 mg/dl) dengan adanya tanda dan gejala diabetes, dianggap memiliki diabetes. Diagnosis dapat ditegakkan minimal uji pada salah satu kriteria diulangi sebanyak dua kali atau uji dilakukan dengan dua kriteria yang memiliki nilai di atas ambang normal kadar glukosa atau HbA1c yang ditetapkan (ADA, 2019). Untuk membantu penegakan diagnosis DM juga dapat dilihat dari tanda dan gejala khas berupa poliuria (sering buang air kecil), polidipsia (sering haus), ketonuria, dan berkurangnya berat badan (Koda-Kimble dkk., 2013).

#### 2.1.5 Tinjauan Tentang Terapi Diabetes Melitus

Penatalaksanaan diabetes mempunyai tujuan untuk menghilangkan keluhan DM, meningkatkan kualitas hidup, menurunkan risiko komplikasi akut dan kronis, dan menurunkan morbiditas dan mortalitas DM. Komponen utama dalam terapi diabetes adalah pengaturan nutrisi, olahraga dan obat-obatan (Pamela dkk., 2019).

##### a. Non Farmakoterapi

##### 1) Pengaturan Nutrisi

Asupan nutrisi yang disarankan yaitu 45-65 % karbohidrat dari total asupan energi, 20-25% lemak dari kebutuhan kalori dengan lemak jenuh kurang dari 7% total kalori, 10-20% protein dari total asupan energi. Pasien juga dianjurkan membatasi asupan natrium  $<2300$  mg/hari dan konsumsi 20-35 gram serat setiap harinya (Soelistijo dkk., 2015). Resistensi insulin dan fungsi sel  $\beta$  dapat membaik dengan pengurangan berat badan. Kadar HbA1c dapat menurun sebesar 0,6% dengan pengurangan 5% berat badan (Pamela dkk., 2019).



## 2) Olahraga

Aktivitas fisik yang dianjurkan meliputi setidaknya 150 menit/minggu latihan dengan intensitas sedang (50%-70% denyut jantung maksimal) setidaknya tiga hari seminggu dengan tidak lebih dari dua hari antara aktivitas. Latihan kekuatan disarankan setidaknya dua kali seminggu selama pasien tidak memiliki retinopati diabetik proliferatif. Latihan aerobik dapat meningkatkan sensitivitas insulin, sedikit meningkatkan kontrol glikemik pada sebagian besar individu, mengurangi risiko kardiovaskular, dan berkontribusi terhadap penurunan berat badan (Dipiro dkk., 2015). Intensitas latihan fisik pada penderita DM yang relatif sehat bisa ditingkatkan, sedangkan pada penderita DM yang disertai komplikasi intensitas latihan perlu dikurangi dan disesuaikan dengan kondisi penderita (Soelistijo dkk., 2015).

## b. Farmakoterapi

Sembilan golongan obat antidiabetes oral yang saat ini disetujui untuk terapi pada pasien DM, yaitu:

### 1) Inhibitor enzim $\alpha$ -glukosidase

Inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase yang saat ini disetujui oleh FDA adalah akarbose dan miglitol (Gourgari dkk., 2017). Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase menghambat secara kompetitif terhadap enzim maltase, isomaltase, sukrase, dan glukamilase di usus halus, memperlambat pemecahan sukrosa dan karbohidrat kompleks. Hal tersebut mengakibatkan perlambatan absorpsi karbohidrat sehingga memberikan waktu tambahan untuk pankreas mengeluarkan cukup insulin untuk meregulasi glukosa. Enzim  $\alpha$ -amilase juga dapat dihambat oleh inhibitor  $\alpha$ -glukosidase, penghambatan aktivitas kedua enzim ini efektif untuk memperlambat pencernaan dan absorpsi karbohidrat, sehingga kadar glukosa *postprandial* menurun (Kalra, 2014; Chigurupati dkk., 2019). Golongan obat ini memiliki beberapa efek samping, yaitu: diare, nyeri perut, flatulensi dan peningkatan transaminase (Koda-Kimble dkk., 2013).

### 2) Biguanida

Golongan biguanida yang masih digunakan sebagai obat antidiabetes adalah metformin. Metformin bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin di hati

dan jaringan perifer (otot) dengan meningkatkan *uptake* glukosa, selain itu metformin menghambat glikogenolisis dan glukoneogenesis (Koda-Kimble dkk., 2013). Obat ini memiliki beberapa efek samping, yaitu: mual, muntah, diare, nyeri perut, anoreksia, penurunan penyerapan vitamin B12, eritema, pruritus, urtikaria, hepatitis, rasa logam, dan asidosis laktat (Ganesan dan Sultan, 2019).

### 3) Tiazolidindion (TZD)

Pioglitazone dan rosiglitazone adalah dua obat golongan TZD. TZD berkerja dengan berikatan pada reseptor PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator activator receptor- $\gamma$* ) di otot, jaringan lemak, dan hati untuk menurunkan resistensi insulin. Obat ini memiliki beberapa efek samping, yaitu: edema, hipoglikemia, gagal jantung, sakit kepala, patah tulang, mialgia, sinusitis, dan faringitis (Ganesan dan Sultan, 2019).

### 4) Sulfonilurea

Sulfonilurea meningkatkan produksi insulin dengan mengikat reseptor sulfonilurea spesifik pada sel  $\beta$ -pankreas, menyebabkan saluran kalium sensitif ATP tertutup sehingga terjadi depolarisasi membran. Saluran kalsium terbuka dan memungkinkan kalsium masuk ke dalam sel. Peningkatan kalsium intraseluler menyebabkan translokasi granula sekretori insulin ke permukaan sel dan eksositosis granula insulin yang dihasilkan (Tripathi dan Saboo, 2019). Sulfonilurea generasi pertama (asetoheksamida, klorpropamida, tolazamida dan tolbutamida) memiliki potensi relatif lebih rendah dibandingkan dengan obat generasi kedua (gliburida, glipizida, glikazida, glimepirida, dan glikuidon). Efek samping dari obat ini adalah ataksia, depresi, hipoestesi, insomnia, nyeri, paresthesia, kantuk, sakit kepala, diaforesis, pruritus, hipoglikemia, peningkatan laktat dehidrogenase, diare, perut kembung, dispepsia, dan muntah (Ganesan dan Sultan, 2019)

### 5) Meglitinida

Meglitinida meningkatkan sintesis dan sekresi insulin dengan cara berikatan ke situs benzamido pada reseptor sulfonilurea, sehingga menghambat kanal kalium sensitif ATP, akibatnya kanal kalsium terbuka dan menyebabkan peningkatan kalsium intraselular (Tripathi dan Saboo, 2019). Contoh obat golongan

meglitinida adalah nateglinide dan repaglinide (Dipiro dkk., 2015). Efek samping golongan obat ini adalah sakit perut, diare, konstipasi, mual, muntah, hipoglikemia, hipersensitifitas dan gangguan penglihatan (Pamela dkk., 2019).

#### 6) Inhibitor DPP-4 (*Dipeptidyl Peptidase 4*)

Inhibitor DPP-4 yang disetujui oleh FDA adalah saxagliptin, sitagliptin, linagliptin, dan alogliptin. Penghambatan terhadap enzim DPP-4 akan memperpanjang waktu paruh GLP-1 (*glucagon like peptide 1*) dan GIP (*gastric inhibitory polypeptide*). GLP-1 dan GIP adalah hormon inkretin yang berfungsi untuk meningkatkan sekresi insulin, menghambat glukagon, dan memperlambat pengosongan lambung (Tripathi dan Saboo, 2019). Efek samping dari obat ini adalah meningkatkan resiko infeksi nasofaringitis, infeksi saluran nafas atas, sinusitis, infeksi saluran kemih dan sakit kepala (Ganesan dan Sultan, 2019).

#### 7) Inhibitor *sodium-glucose cotransporters 2* (SGLT2)

Beberapa inhibitor SGLT2 telah disetujui oleh FDA termasuk *canagliflozin*, *dapagliflozin*, dan *empagliflozin*. Reabsorpsi glukosa dari urin dalam tubulus proksimal difasilitasi oleh SGLT, dengan menghambat SGLT2 maka reabsorpsi glukosa di tubulus proksimal akan menurun sehingga kadar glukosa plasma menurun dan terjadi glukosuria (Suharti dkk., 2016). Efek samping dari obat ini adalah dislipidemia, hiperfosfatemia, hipovolemia, mual, jamur vaginosis, infeksi saluran kemih, peningkatan produksi urin, disuria, influenza, patah tulang, dan gangguan ginjal (Ganesan dan Sultan, 2019).

#### 8) Agonis dopamin

*Bromocriptine mesylate* adalah agonis dopamin yang telah disetujui oleh FDA sebagai salah satu farmakoterapi pada DM tipe 2. Kadar dopamin hipotalamus yang rendah mengurangi aktivitas simpatik. Efek ini meningkatkan sensitivitas insulin di hati dan menurunkan *output* glukosa hepatic (Dipiro dkk., 2015). Efek samping yang umum adalah hipotensi, pusing, pingsan, mual, mengantuk, sakit kepala, dan eksaserbasi gangguan psikotik (Koda-Kimble dkk., 2013).

### 9) *Bile Acid Sequestrants*

*Bile Acid Sequestrants* yang telah disetujui untuk terapi pada DM tipe 2 adalah colesevelam. Mekanisme hipoglikemik yang mungkin termasuk efek pada reseptor X farnesoid dan *Takeda G-protein receptor 5* (TGR5) dalam usus serta efek pada reseptor X farnesoid dalam hati. Colesevelam terbukti dapat memengaruhi sekresi GLP-1 dan GIP (Dipiro dkk., 2015). Efek samping utama dari obat ini adalah gangguan saluran cerna (Koda-Kimble dkk., 2013).

Tiga golongan obat injeksi juga tersedia untuk pengobatan diabetes, yaitu : insulin, agonis reseptor GLP-1, dan *amylinomimetics*. Berdasarkan lama kerja, insulin terbagi menjadi 5 jenis (Soelistijo dkk., 2015), yaitu :

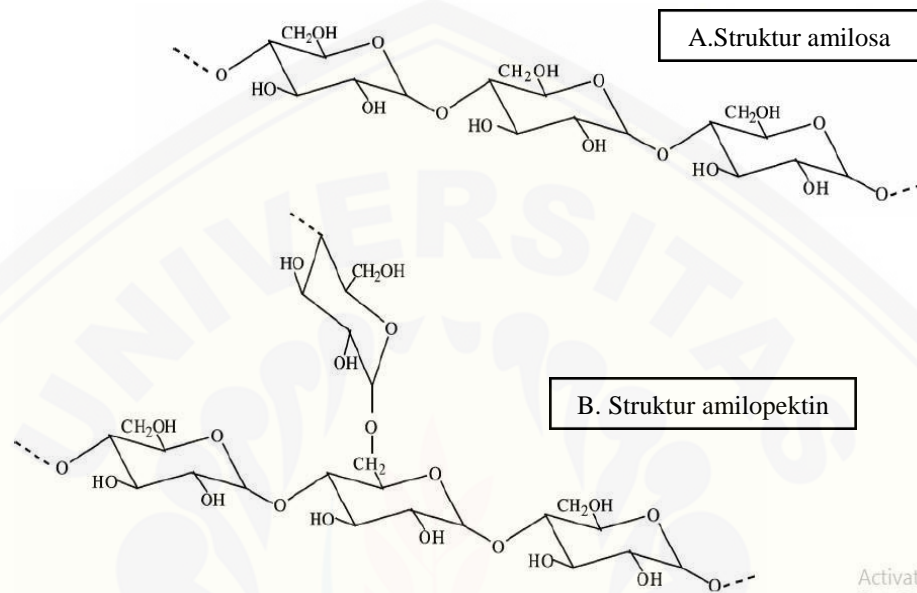
- 1) Insulin kerja cepat (*Rapid-acting insulin*)
- 2) Insulin kerja pendek (*Short-acting insulin*)
- 3) Insulin kerja menengah (*Intermediate acting insulin*)
- 4) Insulin kerja panjang (*Long-acting insulin*)
- 5) Insulin kerja ultra panjang (*Ultra long acting insulin*)

Agonis reseptor GLP-1 bekerja dengan meningkatkan produksi insulin, menghambat sekresi glukagon yang mengakibatkan penurunan produksi glukosa oleh hati, meningkatkan rasa kenyang, menghambat pengosongan lambung, dan mengurangi berat badan (Dipiro dkk., 2015). *Amylinomimetics* (Pramlintide) adalah analog sintetik amylin, neurohormon yang disekresi dari sel- $\beta$  dengan insulin. Pramlintide menekan sekresi glukagon, meningkatkan rasa kenyang, dan memperlambat pengosongan lambung (Koda-Kimble dkk., 2013).

## 2.2 Digesti dan Absorpsi Karbohidrat

Pati adalah polimer glukosa yang dihubungkan melalui C1 oksigen, yang dikenal sebagai ikatan glikosidik (Asif dkk., 2011). Pada akhir rantai polimer terdapat aldehida, dikenal sebagai ujung pereduksi. Amilosa dan amilopektin adalah dua polimer glukosa yang terdapat pada pati yang memiliki struktur dan sifat yang berbeda (Gambar 2.1). Amilosa merupakan polimer lurus yang tersusun dari 6000 unit glukosa yang dihubungkan melalui ikatan glikosidik  $\alpha$ -(1,4),

sedangkan amilopektin tersusun dari 10-60 unit glukosa rantai lurus yang dihubungkan melalui ikatan  $\alpha$ -(1,4) pendek dan 15-45 unit glukosa rantai samping yang dihubungkan melalui ikatan  $\alpha$ -(1,6) (Souza & Magalhaes, 2010).



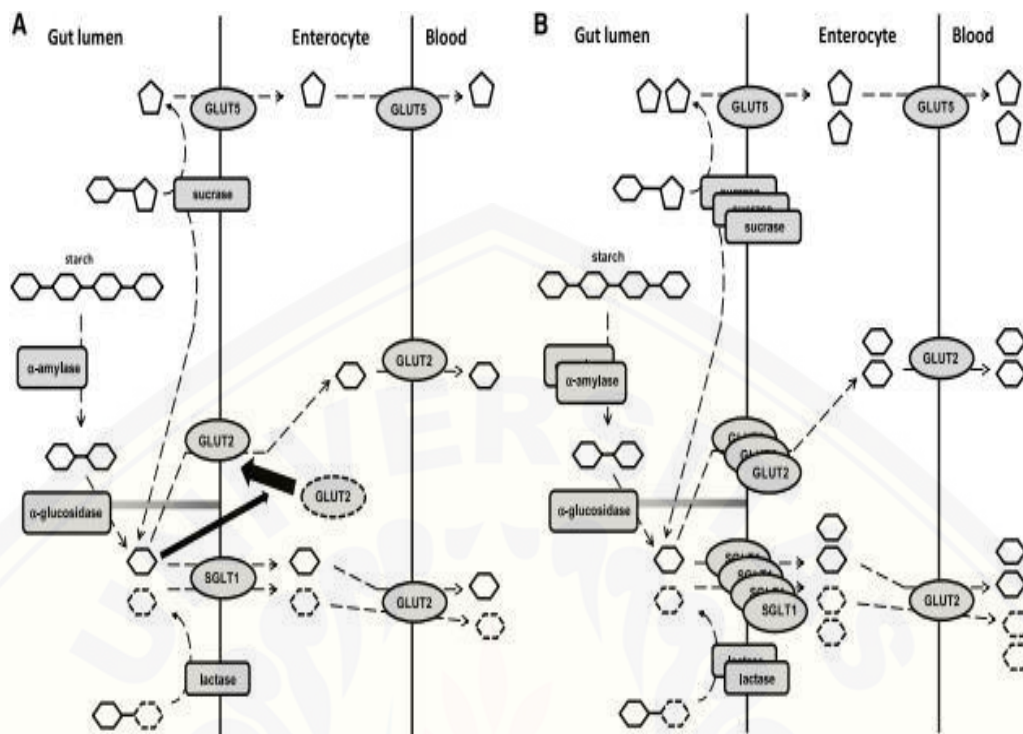
Gambar 2.1 Polimer glukosa pada pati: (A) amilosa dan (B) amilopektin (Souza & Magalhaes, 2010)

Pencernaan karbohidrat dimulai dari mulut melalui sekresi enzim  $\alpha$ -amilase saliva (atau ptyalin) yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 dari pati (atau amilum) dan mengubahnya menjadi maltosa. Enzim berikutnya adalah amilase pankreas (atau amilopsin) di usus halus yang mencerna 60% pati (Williamson, 2013). Kemudian enzim pada sel epitel usus mendegradasi maltosa menjadi karbohidrat 6 karbon. Enzim ini adalah laktase untuk degradasi laktosa menjadi glukosa dan galaktosa, sukrase untuk degradasi sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, dan maltase untuk degradasi maltosa menjadi dua molekul glukosa (Dashty, 2013)

Glukosa adalah produk utama dari hasil pencernaan pati dan disakarida. Glukosa bersifat sangat hidrofilik sehingga tidak dapat melintasi membran biologis tanpa bantuan. Glukosa diabsorpsi dan bergerak antar jaringan menggunakan transporter, terutama terdiri dari *glucose transporter* (GLUT) dan

*sodium glucose cotransporter* (SGLT) (Deng dan Yan, 2016). GLUT2 adalah transporter fasilitatif yang bertanggung jawab untuk penyerapan glukosa di usus. Setelah glukosa diabsorpsi ke dalam darah dari usus, glukosa masuk ke sel  $\beta$  melalui GLUT2 dan selanjutnya fosforilasi glukosa akan merangsang sekresi insulin. Insulin mencapai sel otot dan adiposa, menyebabkan relokasi GLUT4 ke membran sel dan memfasilitasi *uptake* glukosa ke dalam jaringan-jaringan ini (Williamson, 2013).

Pada kondisi diabetes, pankreas memproduksi insulin dalam jumlah yang tidak mencukupi untuk regulasi glukosa atau insulin yang diproduksi digunakan secara tidak efektif oleh tubuh. Kondisi ini mengakibatkan *uptake* glukosa oleh sel target akan berkurang sehingga terjadi peningkatan kadar glukosa darah (Suharti dkk., 2016). Pada kondisi diabetes juga banyak enzim dan transporter yang responsif terhadap *uptake* glukosa di usus mengalami peningkatan regulasi pada kondisi diabetes (Gambar 2.2 B). Pada duodenum DM tipe 2 protein SGLT1 meningkat jumlahnya hingga empat kali lipat, mRNA enzim sukrase dan laktase meningkat dua hingga tiga kali lipat, mRNA GLUT2 juga meningkat tiga kali lipat. Enzim  $\alpha$ -amilase juga lebih tinggi pada diabetes. Peningkatan regulasi enzim dan transporter ini akan berkontribusi pada kondisi gangguan toleransi glukosa, yang akan menyebabkan eksaserbasi kontrol glukosa yang buruk pada diabetes (Williamson, 2013).



Gambar 2.2 Mekanisme absorpsi glukosa di usus halus pada kondisi normal (A) dan kondisi DM (B) (Williamson, 2013)

### 2.3 Enzim $\alpha$ -Amilase

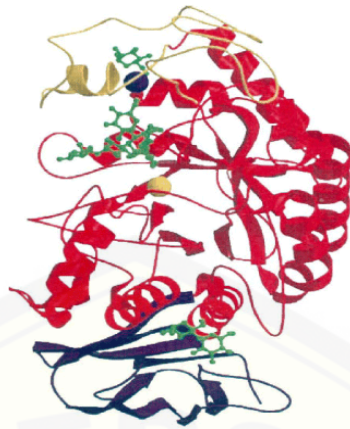
Enzim adalah kelas protein yang dapat meningkatkan laju reaksi kimia tanpa dikonsumsi dalam proses (Blanco dan Blanco, 2017). Enzim mempercepat perubahan molekul awal yang disebut substrat menjadi molekul lain yang disebut produk, meningkatkan laju reaksi setidaknya  $10^6$  kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Enzim merupakan katalis yang sangat selektif, bersifat spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalisis maupun satu substrat atau sekelompok kecil substrat yang berhubungan erat (Murray dkk., 2017).

Enzim  $\alpha$ -Amilase atau  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolase adalah salah satu enzim yang disekresi utamanya oleh pankreas (sekitar 5–6%) dan kelenjar ludah, berperan dalam pencernaan pati dan glikogen.  $\alpha$ -Amilase mendegradasi amilopektin dan amilosa melalui hidrolisis pada ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4, tetapi tidak bisa menghidrolisis ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,6 (Saini dkk., 2017). Oligosakarida dengan konfigurasi  $\alpha$  dan  $\alpha$  limit dekstrin yang panjangnya bervariasi, yaitu

campuran maltotriosa, maltosa, dan oligosakarida bercabang merupakan produk akhir dari aksi katalitik enzim  $\alpha$ -amilase.  $\alpha$ -Amilase adalah *endo-acting* enzim, artinya memutus ikatan secara acak pada pati dari dalam bukan pada ujung terminal dan merupakan kalsium *metalloenzymes*, yaitu tidak dapat mengkatalisis jika tidak ada kalsium (Souza dan Magalhães, 2010).

$\alpha$ -Amilase memiliki berat molekul sebesar 57,6 kDa.  $\alpha$ -Amilase berupa rantai oligosakarida tunggal yang tersusun dari 512 asam amino. Susunan struktur tiga dimensi  $\alpha$ -Amilase memungkinkan enzim ini memiliki kemampuan untuk berikatan dengan substrat dan dapat memutus ikatan glikosidik melalui aksi katalitik yang spesifik. Enzim  $\alpha$ -Amilase tersusun dari 3 domain yaitu A, B, dan C (Gambar 2.3). Domain A ditunjukkan dengan warna merah, domain B ditunjukkan dengan warna kuning, dan domain C ditunjukkan dengan warna biru. Domain A adalah domain terbesar berbentuk super struktur  $(\beta/\alpha)_8$ . Domain B terletak di antara domain C dan A dan menempel dengan domain A melalui ikatan disulfida. Domain C berbentuk lembaran  $\beta$  yang terhubung ke domain A melalui rantai polipeptida sederhana. Situs aktif enzim ditunjukkan dengan warna hijau terletak pada bagian akhir gugus karboksil domain A dan B. Situs pengikatan substrat tersusun dari lima subsitus, dan aksi katalitik enzim terjadi pada subsitus 3. Pada enzim  $\alpha$ -Amilase terdapat ion kalsium yang ditunjukkan dengan bulatan biru dan ion klorida yang ditunjukkan dengan bulatan kuning. Ion kalsium berfungsi untuk menstabilkan struktur dan mengaktivasi alosterik (Souza dan Magalhães, 2010; Rani dkk., 2015).





Gambar 2.3 Struktur enzim  $\alpha$ -amilase (Souza dan Magalhães, 2010)

$\alpha$ -Amilase mengkatalisis hidrolisis pati melalui mekanisme perpindahan ganda yang melibatkan pembentukan dan hidrolisis ikatan kovalen enzim  $\beta$  *glycosyl intermediate* dengan menggunakan situs aktif asam karboksilat (Rani dkk., 2015). Glu233, Asp197, dan Asp300 berfungsi sebagai asam amino katalitik. Asp197 merupakan nukleofil yang menyerang pusat anomer gula pada substrat, membentuk ikatan kovalen reaksi intermediet. Pada langkah ini, reduksi ujung substrat memotong kerangka gula. Pada langkah kedua molekul air memutuskan ikatan kovalen antara Asp197 dengan substrat dan mengikat gugus hidroksil ke pusat anomer. Pada kedua langkah tersebut Glu233 dan Asp300 baik secara individu atau kolektif bertindak sebagai katalis asam/basa (Sales dkk., 2012).

#### 2.4 Inhibitor Enzim $\alpha$ -Amilase

Inhibitor enzim adalah senyawa yang dapat mengurangi atau sepenuhnya menghambat fungsi katalitik enzim dengan mengganggu setiap langkah dalam siklus katalitik, biasanya memiliki berat molekul yang rendah (Sharma, 2016). Inhibitor enzim dapat dibedakan berdasarkan sifat kestabilan penghambatan menjadi 2 jenis yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel (Blanco dan Blanco, 2017). Inhibitor irreversibel adalah inhibitor yang berikatan secara

kovalen atau non kovalen stabil dengan situs aktif enzim, selain itu juga dapat menyebabkan kerusakan pada beberapa gugus fungsi di sisi katalitik enzim. Inhibitor reversibel adalah inhibitor yang bekerja dengan mengikat sisi aktif enzim melalui ikatan non kovalen yang bersifat reversibel dan dapat dipisahkan kembali dari ikatannya (Sharma, 2016).

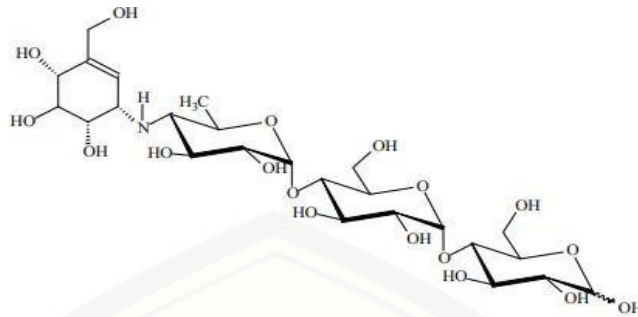
Inhibitor reversibel dapat diklasifikasikan menjadi kompetitif, nonkompetitif atau unkompetitif (Sharma, 2016). Pada inhibisi kompetitif, substrat dan inhibitor tidak bisa berikatan pada enzim dalam waktu yang bersamaan, karena inhibitor kompetitif mempunyai struktur yang menyerupai substrat dan berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan situs aktif enzim. Inhibitor nonkompetitif berikatan dengan enzim bebas atau dengan kompleks enzim-substrat, menyebabkan perubahan pada struktur situs aktif sehingga substrat tidak dapat masuk ke situs aktif. Inhibitor nonkompetitif berikatan tidak pada situs aktif enzim. Inhibitor unkompetitif berikatan dengan kompleks enzim-substrat (Gonçalves dan Romano, 2017).

Pendekatan terapeutik untuk pengobatan DM tipe 2 salah satunya adalah menurunkan gula darah postprandial, yaitu dengan cara memperlambat absorpsi glukosa melalui penghambatan pada enzim penghidrolisis karbohidrat,  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Obat-obatan golongan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dapat menghambat enzim  $\alpha$ -amilase (Kalra, 2014). Terdapat 2 obat golongan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang disetujui oleh FDA yaitu akarbose dan miglitol (Dipiro dkk., 2015). Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang paling banyak digunakan adalah akarbose.

## 2.5 Akarbose

Akarbose diindikasikan untuk mengurangi kadar glukosa darah pada penderita DM tipe 2 dengan kadar HbA1c mendekati target dan kadar glukosa plasma puasa mendekati normal tetapi kadar glukosa plasma postprandial tinggi (Dipiro dkk., 2015). Akarbose secara kompetitif dan reversibel menghambat  $\alpha$ -glukosidase (maltase, sukrase, glukomaltase, dan isomaltase) dan  $\alpha$ -amilase sehingga menunda pencernaan kompleks karbohidrat yang kemudian menghambat penyerapan glukosa dan menurunkan hiperglikemia postprandial (Kalra, 2014). Akarbose dapat menurunkan konsentrasi glukosa postprandial 40 hingga 50 mg/dL (Manaf, 2010). Efek samping penggunaan akarbose diantaranya adalah gangguan gastrointestinal, diare, lebih banyak flatus, perut kurang enak, dan peningkatan transaminase (Koda-Kimble dkk., 2013).

Akarbose adalah pseudo-tetrasakarida yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri *Actinoplanes utahensis* (Gambar 2.4). Akarbose terdiri dari polihidroksilasi turunan aminosikloheksana (*valienamine*) yang dihubungkan melalui atom nitrogennya ke 6-*deoxyglucose* yang dengan sendirinya ikatan  $\alpha$ -1,4 terhubung ke bagian maltosa. Akarbose memiliki afinitas  $10^4$  sampai  $10^5$  lebih tinggi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase dibandingkan substrat (Rosak dan Mertes, 2012). Akarbose memiliki nitrogen antara molekul glukosa pertama dan kedua. Modifikasi ini membuat akarbose memiliki afinitas yang sangat tinggi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase. Pencernaan karbohidrat akan terhambat selama akarbose terikat pada enzim. Mekanisme penghambatannya disebabkan oleh cincin sikloheksen tak jenuh dan ikatan glikosidik nitrogen yang meniru keadaan transisi untuk pemutusan enzimatik glikosidik (Sales dkk., 2012).



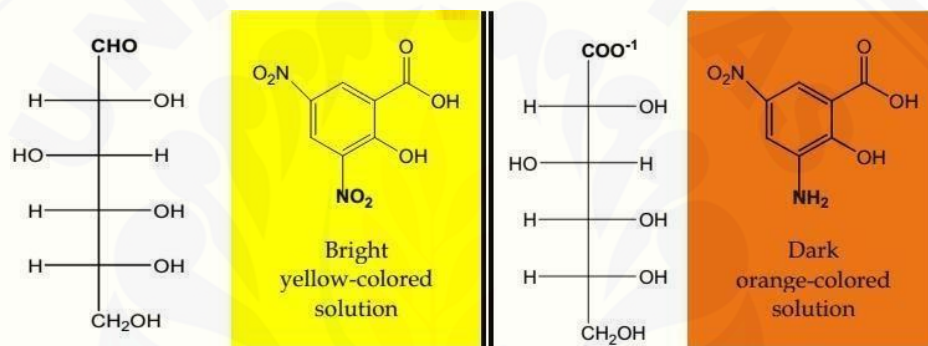
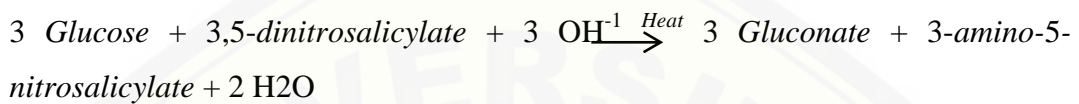
Gambar 2.4 Formula Struktur Akarbose (Sales dkk., 2012)

## 2.6 Uji Penghambatan Enzim $\alpha$ -Amilase

Enzim  $\alpha$ -amilase mengkatalisis hidrolisis dari  $\alpha$ -1,4-glikosidik polisakarida menjadi maltotriosa, maltosa, dan oligosakarida bercabang (Souza dan Magalhães, 2010). Tiga metode uji penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase yang umum digunakan adalah metode *dinitrosalicylic acid* (DNSA) (Miller, 1959), *starch iodine colour assay* (Xiao dkk., 2006), dan *modified starch iodine protocol* (Hossain dkk., 2009). Prinsip metode ini didasarkan pada pengukuran konsentrasi produk, yaitu gula reduksi dengan reagen asam dinitrosalisilat (DNS), sedangkan yang lain didasarkan pada pengukuran konsentrasi residu substrat dengan iodin (Fuwa, 1954).

Metode DNS dilakukan dengan penambahan sampel, dapar fosfat, larutan  $\alpha$ -amylase, dan larutan pati (Nugraha dan Hasanah, 2018). Katalisis oleh enzim  $\alpha$ -amilase dapat dihentikan dengan proses pemanasan yang menyebabkan perubahan konfigurasi dari  $\alpha$ -amilase sehingga kemampuan katalisis enzim akan hilang. Konsentrasi produk dari katalisis oleh enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan setelah reaksi dihentikan menggunakan reagen pewarna DNS. Reagen yang digunakan adalah larutan yang dibentuk oleh senyawa berikut ini: 2-hidroksi-3,5-asam dinitrobenzoat yang bertindak sebagai oksidan, garam *Rochelle* (potasium sodium tartrat) yang mencegah disolusi oksigen dalam reagen, dan natrium hidroksida untuk menyediakan media yang dibutuhkan untuk terjadinya reaksi redoks (Garriga dkk., 2017).

Metode DNS adalah teknik kolorimetri, terdiri dari reaksi redoks antara 3,5- asam dinitrosalisilat dan gula reduksi pada sampel (Gambar 2.5). Kekuatan reduksi gula berasal dari gugus karbonilnya, yang dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil oleh zat pengoksidasi ringan, sedangkan DNS (kuning) direduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat (merah) yang dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum 540 nm (Miller, 1959). Reaksi reduksi DNS oleh glukosa, yaitu:



Gambar 2.5 Tahapan reaksi reduksi DNS (Timerman, 2012)

Senyawa inhibitor tertentu dapat menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dengan cara menghambat reaksi antara substrat dengan enzim, sehingga tidak terbentuk produk yang berupa gula reduksi. Tidak terbentuknya gula pereduksi menyebabkan intensitas warna yang terbentuk menurun, sehingga absorbansi pada panjang gelombang maksimum menurun (Garriga dkk., 2017). Semakin kecil absorbansi sampel, maka persen penghambatan semakin besar, menunjukkan semakin baik potensinya sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase (Nugraha dan Hasanah, 2018). Akarbose digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase.

IC50 (*Inhibitory Concentration*) adalah parameter penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase. Nilai IC50 adalah konsentrasi ekstrak yang mengandung

inhibitor  $\alpha$ -amilase yang dapat menghambat 50% aktivitas  $\alpha$ -amilase dalam kondisi uji. Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari persamaan regresi linier dengan sumbu x menunjukkan konsentrasi sampel dan sumbu y menunjukkan % inhibisi. Persamaan regresi linier  $y=bx+a$  yang didapatkan, digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  dengan persamaan (Neubig dkk., 2003) :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

keterangan:  $a = \textit{intercept}$

$b = \textit{slope}$

Persentase penghambatan dihitung dengan menggunakan rumus (Nugraha dan Hasanah, 2018) :

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{\text{Abs 540 (kontrol)} - \text{Abs 540 (ekstrak)}}{\text{Abs 540(kontrol)}} \times 100$$

## 2.7 Tinjauan tentang Tanaman Secang

### 2.7.1 Klasifikasi Tanaman Secang

Klasifikasi tanaman secang adalah sebagai berikut (ITIS, 2019):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embryophita
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Caesalpinia</i>
Spesies	: <i>Caesalpinia sappan</i> .

### 2.7.2 Deskripsi dan Morfologi Tumbuhan Secang

Tumbuhan secang hidup di daerah tropis dengan ketinggian 500-1000 mdpl. Sebagian besar tumbuhan secang tumbuh di daerah perbukitan dengan jenis tanah liat dan batuan berkapur pada ketinggian rendah sampai sedang (Mariappan dkk., 2014). Bagian biji ataupun setek batang dapat digunakan untuk perbanyakan tumbuhan secang. Kayu secang dapat dipanen sejak berusia 1-2 tahun. Saat awal setelah ditebang kayu secang berwarna jingga (brazilin) dan setelah terekspos dengan oksigen akan berubah menjadi warna merah (brazilein) (Sari dan Suhartati, 2016). Tumbuhan secang dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Tumbuhan secang (Muhammadiyah, 2019)

Batang tumbuhan secang berkayu dan berbentuk bulat dengan warna hijau kecokelatan. Duri-duri tempel berbentuk bengkok tersebar pada batang dan cabang tumbuhan secang, selain itu pada cabang juga terdapat lentisel. Tumbuhan secang memiliki habitus berupa perdu atau semak dengan tinggi hingga 10 m. Bunga tumbuhan secang berupa bunga majemuk berbentuk malai, tumbuh dari ujung tangkai dengan panjang hingga 40 cm, mahkota bunga berwarna kuning dan berbentuk tabung. Buah tanaman secang berbentuk polong dengan panjang hingga 10 cm dan lebar hingga 4 cm, ujungnya berbentuk paruh berisi 3-4 biji. Biji secang berbentuk bulat memanjang dengan panjang hingga 7 mm, tebal hingga 7 mm, berwarna coklat dan menghitam jika masak. Tumbuhan secang memiliki

akar tunggang berwarna coklat. Daun tumbuhan secang berbentuk majemuk menyirip ganda dengan panjang hingga 40 cm, anak daun berhadapan berjumlah 10-20 pasang. Anak daun berbentuk lonjong, tidak bertangkai, panjang hingga 25 mm, dan lebar hingga 11 mm (Nirmal dkk., 2015; Sari dan Suhartati, 2016).

### 2.7.3 Kandungan dan Manfaat Kayu Secang

Kayu secang adalah salah satu tumbuhan yang populer sebagai obat tradisional, pewarna kain dan pewarna makanan. Masyarakat Sulawesi Selatan, khususnya Suku Bugis-Soppeng menggunakan air secang sebagai minuman sehari-hari (Sari dan Suhartati, 2016). Kayu secang memiliki aktivitas antioksidan sebesar 80,46-89,13%, antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, antikanker terhadap kanker payudara, anti-inflamasi dan proteksi pada sistem kardiovaskular (Lee dkk., 2010; Widowati, 2011; Tao dkk., 2013; Jung dkk., 2015; Puttipan dkk., 2018).

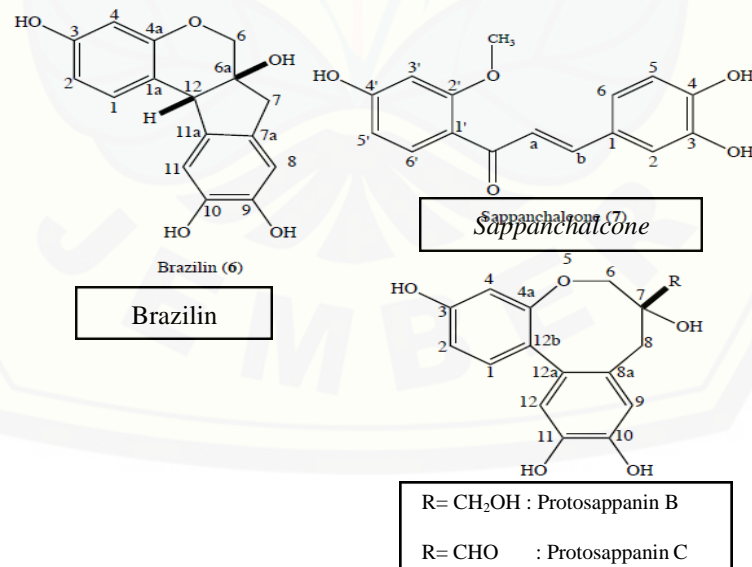
Ekstrak kayu secang mengandung terpenoid, triterpenoid, alkaloid, saponin, flavonoid sebesar  $9,588 \pm 2,198$  mg QE/g sampel, fenol total ekivalen epigalokatekin (EGC) sebesar 849,11  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dan ekivalen epikatekin galat (ECG) sebesar 825,11  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Widowati, 2011; Muhammadiyah, 2019). Senyawa fenolik utama yang terkandung pada kayu secang dibagi menjadi empat sub tipe struktural: yaitu brazilin, *chalcone*, protosappanin dan homisoflavonoid. Berbagai senyawa dalam kayu secang telah teridentifikasi dan terisolasi, diantaranya 3'-*Deoxy-4-O-methylepisappanol*, *sappanone B*, (+)-(8*S*, 8'*S*)-*bisdihydrosiringenin*, 3-*deoxysappanchalcone*, (+)-*lyoniresinol*, 3-*deoxy-sappanone B*, 3'-*O-methylbrazilin*, *sappanchalcone*, asam palmitat, isoprotosappanin *B*, protosappanin *A*, protosappanin *B*, brazilein dan brazilin (Fu dkk., 2008).

Aktivitas antidiabetes dari kayu secang telah dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan sebelumnya, menunjukkan bahwa pemberian minuman secang selama 28 hari pada subjek uji pradiabetes dewasa dapat mengurangi kadar glukosa darah puasa, namun tidak mempengaruhi kadar insulin (Sa' pang, 2015). Ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan dosis 100 mg/kgBB



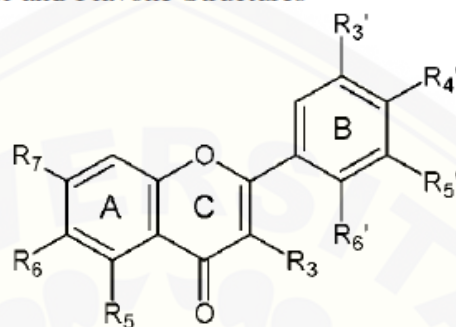
dapat mengurangi kadar glukosa darah sebanding dengan kelompok kontrol positif glibenklamid 0,9 mg/kgBB (Huda, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Saefudin dkk. (2014) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kayu secang dapat mengurangi kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi larutan glukosa 100% dengan dosis 100 mg/0,2 kgBB. Kandungan brazilin dalam kayu secang dapat mengurangi kadar glukosa darah pada tikus dan mencit diabetes yang diinduksi menggunakan streptozotocin tanpa perubahan kadar insulin plasma. Brazilin menghambat glukoneogenesis di hati dengan meningkatkan fruktosa-2,6-bifosfat (Nirmal dkk., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Arsiningtyas (2015) menunjukkan bahwa brazilin, *sappanchalcone*, protosappanin B dan protosappanin C dari ekstrak kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase, selain itu *sappanchalcone* juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase. Brazilin, *sappanchalcone*, protosappanin B dan protosappanin C adalah senyawa fenolik golongan flavonoid (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Struktur Brazilin, *Sappanchalcone*, Protosappanin B, dan Protosappanin C (Arsiningtyas, 2015)

Senyawa golongan flavonoid memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase melalui interaksi pembentukan ikatan hidrogen antara gugus hidroksil pada posisi R6 atau R7 dari cincin A dan posisi R4' atau R5' dari cincin B ligan polifenol dengan residu katalitik dan terbentuknya sistem  $\pi$ -terkonjugasi yang menstabilkan interaksi dengan situs aktif enzim (Takahama dan Hirota, 2018).



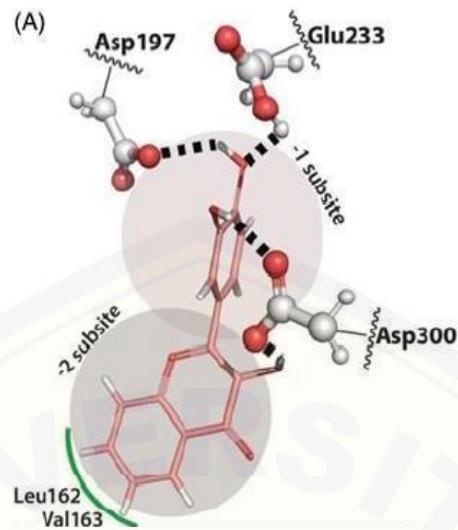
Gambar 2.8 Struktur flavonoid (Proenca dkk., 2019)

## 2.8 Penelitian Lain tentang Kandungan Senyawa dalam Tanaman sebagai Inhibitor Enzim $\alpha$ -Amilase

Senyawa golongan triterpen memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Zhang dkk., 2017). Kandungan senyawa *citral* golongan terpenoid dalam minyak esensial diketahui dapat menghambat enzim  $\alpha$ -amilase (Jelenković dkk., 2014). Senyawa saponin *3-O-[\beta-D-glucopyranosyl-(14)-\beta-D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O-\beta-D-glucopyranosyl ester* dari ekstrak daun *Polyscias fruticosa* mempunyai kemampuan menghambat enzim  $\alpha$ -amilase dan menghasilkan efek sinergis dengan akarbosa untuk menghambat enzim  $\alpha$ -amilase (Hanh dkk., 2016). Senyawa golongan alkaloid diketahui memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -amilase (Tintu dkk., 2012). Tanin terhidrolisis dari *gallnuts* dan tanin terkondensasi dari *Acacia mearnsii* memiliki kemampuan untuk menghambat enzim  $\alpha$ -amilase (Kato dkk., 2017). Senyawa golongan antrakinon dari *Rheum emodi* diketahui memiliki aktivitas anti hiperghlikemik dan penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase (Arvindekar dkk., 2015).

Senyawa fenolik telah banyak diteliti untuk mengendalikan pencernaan pati, dan flavonoid telah banyak diteliti sebagai penghambat  $\alpha$ -amilase (Gonçalves dan Romano, 2017). Potensinya berkorelasi dengan jumlah gugus hidroksil pada cincin B flavonoid. Kapasitas penghambatan enzim dari flavonoid tergantung pada ikatan hidrogen antara gugus hidroksil dari ligan polifenol dan residu katalitik dari situs pengikatan dan pembentukan sistem  $\pi$ -terkonjugasi yang menstabilkan interaksi dengan situs aktif (Takahama dan Hirota, 2018).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa fenolik dalam kedelai dapat menghambat pencernaan dan absorpsi karbohidrat melalui inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Ademiluyi dan Oboh, 2013). Senyawa fenolik dari ekstrak *Eucalyptus grandis* poten menginhibisi aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase sehingga dapat mencegah hiperglikemia (Jiang dkk., 2017). Flavonoid dari ekstrak *Scutellaria baicalensis* memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Li dkk., 2018). Penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase oleh flavonoid sangat tergantung pada sifat dan posisi substituen, flavon terklorinasi efektif sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase. Aktivitas ini diduga karena keberadaan gugus hidroksil pada R5 dan R7 pada cincin A dan posisi R3' dan R4' pada cincin B, dan keberadaan ion klorida pada posisi R3 cincin C, serta ikatan rangkap antara C2 dan C3 (Proenca dkk., 2019). Golongan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas yang kuat sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase berikatan dengan situs pengikatan yang sama dengan *valienamine* dari akardiose yaitu pada *subsite* -1 pada residu katalitik Asp<sup>197</sup>, Glu<sup>233</sup>, dan Asp<sup>300</sup> dan membentuk ikatan hidrogen dengan situs katalitik (Gambar 2.9).



Gambar 2.9 Prediksi ikatan flavonoid dengan Asp197, Glu233, Asp300, Leu162 dan Val163 menempati *subsite* -2 dan -1 (Proenca dkk., 2019)

## 2.9 Skrining Fitokimia

Fitokimia adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh tumbuhan, dan senyawa ini memiliki aktivitas biologis (Mendoza dan Silva, 2018). Skrining fitokimia adalah prosedur yang cepat dan murah untuk menentukan golongan metabolit sekunder atau kandungan senyawa dalam tumbuhan. Setiap golongan metabolit sekunder memiliki aktivitas biologis tertentu, maka berdasarkan hasil yang diperoleh dari pendahuluan skrining fitokimia dapat dijadikan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas biologis tanaman yang diteliti. Skrining fitokimia dilakukan dengan mereaksikan ekstrak tanaman yang diuji dengan pereaksi yang selektif terhadap golongan senyawa (Mera dkk., 2019). Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan reaksi warna, reaksi endapan atau menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Perubahan kualitatif yang dapat diamati adalah perubahan partisi cair-cair pada pelarut, pengendapan, perubahan kolorimetri dan perubahan fluoresensi. Golongan-golongan senyawa yang dapat dianalisis diantaranya adalah: polifenol dan tanin; alkaloid; flavonoid; glikosida saponin; triterpenoid dan steroid; dan antrakinon (Depkes RI, 1995).

Dalam skrining fitokimia pemilihan pelarut dan metode ekstraksi berperan sangat penting. Pemilihan pelarut berdasarkan polaritas senyawa yang akan diekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi berdasarkan jenis, sifat fisik dan kimia senyawa yang akan diekstraksi (Harborne, 1984). Beberapa variasi pada metode ekstraksi dapat mempengaruhi komposisi dan kuantitas metabolit sekunder pada ekstrak yaitu: waktu ekstraksi, tipe ekstraksi, sifat solven, konsentrasi solven, polaritas, dan suhu (Tiwari dkk., 2011).



## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *experimental laboratories* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan*) terhadap inhibisi aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase secara in vitro.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dimulai pada bulan Oktober – selesai.

### 3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kayu secang.
- b. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antidiabetes melalui inhibisi  $\alpha$ -amilase dengan parameter  $IC_{50}$ .
- c. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pelarut, metode ekstraksi, dan metode pengujian aktivitas antidiabetes melalui inhibisi  $\alpha$ -amilase.

### 3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi ekstrak kayu secang yang dapat menghambat 50% aktivitas  $\alpha$ -amilase dalam kondisi uji.
- b. Nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan aktivitas inhibisi sangat kuat,  $IC_{50}$  50-100  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan aktivitas kuat,  $IC_{50}$  101-150  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan aktivitas sedang, dan  $IC_{50}$  151-200  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan aktivitas lemah (Blois, 1958).

### 3.5 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.5.1 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan*) (dari desa Banaresep Barat, Kecamatan Lenteng, Kabupaten Sumenep yang telah dideterminasi di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember), etanol 96 %, metanol, akuabides, akuades, akarboses (Sigma-Aldrich), enzim  $\alpha$ -amilase (dari *porcine*, Sigma-Aldrich), sodium *potato starch* (Sigma-Aldrich), sodium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 3,5-dinitrosalisilat acid (Sigma-Aldrich), sodium potassium tartrate (Sigma-Aldrich), dan natrium hidroksida (NaOH).

#### 3.5.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometri (Labomed, Inc UVD-2950), mikropipet (Socorex), tip, kuvet, alat-alat gelas, kertas saring, maserator, *rotary evaporator*, neraca analitik (Ohaus), pH meter (Denver Instrument), *hot plate*, dan *waterbath*.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Simplisia

Kayu secang diambil dari pohon dewasa dengan tinggi sekitar 5 meter, mulai dari pangkal batang paling bawah yang tumbuh diatas tanah sampai 1,5 meter dari permukaan tanah, kemudian bagian kulit batang dan pengotor dibersihkan lalu kayu diserut. Hasil serutan kayu diangin-anginkan untuk mengurangi kadar air dan mencegah tumbuhnya jamur karena adanya air. Serutan kayu secang kemudian dihaluskan dengan alat penggiling untuk menghasilkan serbuk kayu secang.

#### 3.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Kayu Secang

Ekstrak pada penelitian ini dibuat dengan metode maserasi. Ekstrak dibuat dengan menimbang 250 gram serbuk kayu secang, kemudian direndam dalam 2,5

L etanol 96 % selama 2 x 24 jam. Ekstrak pekat dibuat dengan menyaring filtrat yang diperoleh dengan corong *buchner* lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan sisa pelarut diuapkan pada suhu 40°C menggunakan oven sampai bobot ekstrak konstan (Muhammadiyah, 2019).

### 3.6.3 Skrining Fitokimia

#### 1) Uji Senyawa Golongan Alkaloid

Larutan 1A, 1B dan 1C dibuat dengan mencampurkan 0,3 gram ekstrak dengan 5 ml HCl 2 N kemudian selama 2-3 menit dipanaskan menggunakan penangas air sambil diaduk. Campuran larutan tersebut dicampur dengan 0,3 gram NaCl, diaduk kemudian disaring. Filtrat dicampur dengan 5 ml HCl 2 N kemudian dibagi kedalam tiga tabung reaksi. Pereaksi Mayer ditambahkan pada larutan 1A, pereaksi Wagner ditambahkan pada larutan 1B dan larutan 1C digunakan untuk blanko. Terbentuknya kekeruhan atau endapan menunjukkan ekstrak mengandung alkaloid (Harborne, 1984).

#### 2) Uji Saponin, Triterpenoid, dan Steroid

##### a) Uji buih

Larutan uji dibuat dengan mencampurkan 0,3 gram ekstrak dengan 10 ml air suling kemudian selama 30 detik dikocok dengan kuat. Terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi 3 cm di atas permukaan larutan selama lebih dari 30 menit menunjukkan ekstrak mengandung saponin (Harborne, 1984).

##### b) Reaksi Warna

Larutan uji dibuat dengan melarutkan 0,3 gram ekstrak dalam 15 ml etanol, kemudian dibagi menjadi larutan 2A, 2B, dan 2C. Larutan 2A dipakai sebagai blanko. Uji Liebermann-Burchard dilakukan dengan menambahkan  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  sebanyak 3 tetes dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 1 tetes kedalam 5 ml larutan 2B, kemudian dikocok dan diamati perubahan warna yang terjadi. Ekstrak mengandung saponin steroid jika terbentuk warna hijau biru, triterpen steroid ditunjukkan dengan warna merah ungu dan saponin jenuh ditunjukkan dengan warna kuning muda. Uji Salkowski dilakukan dengan menambahkan 1–2 ml



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan 2C. Steroid tak jenuh ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna merah (Harborne, 1984).

### 3) Uji Senyawa Golongan Flavonoid

Larutan 3A, 3B, dan 3C dibuat dengan mencampurkan 0,3 gram ekstrak dengan 3 ml n-heksana lalu dikocok berulang kali hingga ekstrak n-heksana tidak berwarna, residu kemudian dilarutkan menggunakan etanol. Larutan 3A digunakan sebagai blanko.

#### a) Uji Bate-Smith dan Metcalf

0,5 ml HCl pekat ditambahkan pada larutan 3B kemudian dipanaskan dengan penangas. Leukoantosianin ditunjukkan dengan terjadinya warna merah terang atau ungu.

#### b) Uji Wilstater

Larutan 3C ditambah 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong magnesium kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Larutan ini ditambahkan air suling dan 1 ml butanol. Ekstrak mengandung flavon jika terjadi warna merah jingga, flavonol ditunjukkan dengan merah pucat, dan flavonon ditunjukkan dengan merah tua (Harborne, 1984).

### 4) Uji Senyawa Golongan Antrakinon

#### a) Uji Borntrager

Larutan uji dibuat dengan mengekstraksi 0,3 gram ekstrak dengan 10 ml air suling lalu disaring kemudian filtrat diekstraksi dengan 3 ml toluena dengan corong pisah. Fase toluena dibagi menjadi dua bagian, yaitu larutan 4A dan 4B. Larutan 4A digunakan sebagai blanko. Larutan 4B ditambah ammonia lalu dikocok. Senyawa antrakinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

#### b) Uji Modifikasi Borntrager

Larutan uji dibuat dengan menambahkan 0,3 gram ekstrak dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> encer sebanyak 1 ml dan KOH 5N sebanyak 1 ml. Campuran larutan dipanaskan dan disaring, filtrat ditambah asam asetat glasial lalu diekstraksi menggunakan toluena. Fase toluena dibagi menjadi larutan 4A dan 4B. Larutan 4A dipakai sebagai blanko. Ammonia ditambahkan pada larutan 4B. Ekstrak mengandung

antrakinon jika terbentuk warna merah atau merah muda pada lapisan alkalis (Harborne, 1984).

#### 5) Uji Senyawa Golongan Tanin dan Polifenol

Larutan uji dibuat dengan menambahkan 10 ml akuades panas kedalam 0,3 gram ekstrak lalu tambahkan 3-4 tetes 10% NaCl kemudian diaduk, dan disaring. Filtrat dibagi menjadi larutan 5A, 5B dan 5C.

##### a) Uji Ferriklorida

Larutan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak beberapa tetes diteteskan pada larutan 5C, lalu dilihat perubahan warna yang terjadi. Ekstrak mengandung tanin jika terbentuk warna hijau kehitaman, mengandung polifenol jika tidak terbentuk endapan pada penambahan NaCl dan gelatin tetapi terjadi warna hijau biru hingga hitam setelah ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$ .

##### b) Uji Gelatin

Larutan 5A dipakai sebagai blanko. Larutan 5B ditambah 5 ml larutan NaCl 10% dan sedikit larutan gelatin. Tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih (Harborne, 1984).

#### 4.6.4 Penyiapan Larutan Pereaksi

##### 1) Larutan dapar fosfat pH 6,9

Larutan dapar fosfat pH 6,9 dibuat dengan mencampurkan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (6,90 gram dilarutkan dalam 50 ml akuades) sebanyak 255 ml dengan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M (15,84 gram dilarutkan dalam 600 ml akuades) sebanyak 245 ml (Mohan, 2014).

##### 2) Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 2 M

Larutan NaOH 2 M dibuat dengan melarutkan 0,8 gram NaOH dalam labu ukur dengan akuades hingga 10 ml.

##### 3) Larutan substrat pati 1 %

Larutan substrat pati 1 % dibuat dengan melarutkan 0,1 gram pati dalam labu ukur dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga 10 ml, lalu dipanaskan  $\pm$  5-10 menit sampai larut.

4) Larutan enzim  $\alpha$ -amilase

Larutan enzim  $\alpha$ -amilase dibuat dengan melarutkan 6,25 mg enzim dengan dapar fosfat pH 6,9 sampai 10 ml untuk mendapatkan konsentrasi enzim 10 U/ml kemudian dilakukan pengenceran dengan dapar fosfat pH 6,9. Konsentrasi enzim 1 U/ml, 2 U/ml, dan 3 U/ml dibuat dari konsentrasi 10 U/ml, kemudian dari konsentrasi enzim 1 U/ml dibuat konsentrasi enzim 0,1 U/ml dan 0,5 U/ml.

5) Reagen DNS

Reagen DNS dibuat dengan melarutkan 0,1095 gram DNS dalam labu ukur dengan akuades hingga 5 ml. 3 gram sodium potassium tartrat ditambah 2 ml NaOH 2 M kemudian dipanaskan hingga larut. Larutan DNS dan larutan sodium potassium tartrat kemudian dicampur hingga homogen (Bhutkar dan Bhise, 2012).

6) Larutan akarbose

Larutan akarbose dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 25, dan 50 ppm. Akarbose sebanyak 2,5 mg dilarutkan dengan akuades hingga 50 ml untuk mendapatkan larutan induk dengan konsentrasi 50 ppm. Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 5, 10, dan 25 ppm.

7) Larutan sampel

Larutan induk sampel dengan konsentrasi 2000 ppm dibuat dengan melarutkan 200 mg sampel dalam labu ukur dengan dapar fosfat pH 6,9 hingga 100 ml. Konsentrasi sampel antara 10-2000 ppm dibuat dengan pengenceran larutan induk.

### 3.6.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim $\alpha$ -Amilase

a) Kondisi uji optimal

Uji aktivitas inhibisi  $\alpha$ -amilase dilakukan berdasarkan penelitian Sya'bani (2015) yang dimodifikasi. Pada pengujian ini digunakan larutan kontrol positif (dengan akarbose), larutan kontrol negatif (tanpa larutan sampel atau standar), dan larutan sampel (dengan ekstrak). Panjang gelombang optimal yang digunakan adalah 540 nm, konsentrasi substrat 1%, dan waktu inkubasi 15 menit, konsentrasi enzim 2 U/ml, konsentrasi sampel yang terpilih yaitu 50; 100; 200; 400; 800;

1200 ppm, konsentrasi akarbose yang digunakan yaitu 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 100; dan 150 ppm (Wahyudi, 2015; Sya'bani, 2016).

b) Pengujian aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase

Kontrol negatif (C<sup>-</sup>) dibuat dengan mencampurkan 60  $\mu$ l dapar fosfat pH 6,9 dan 90  $\mu$ l larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Kontrol positif (C<sup>+</sup>) dibuat dengan mencampurkan 60  $\mu$ l akarbose dan 90  $\mu$ l larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Sampel (S) dibuat dengan mencampurkan 60  $\mu$ l larutan ekstrak dan 90  $\mu$ l larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Masing-masing campuran larutan tersebut divortex lalu diinkubasi hingga 15 menit pada suhu 37°C menggunakan *waterbath*. 150  $\mu$ l pati 1% ditambahkan dalam masing-masing tabung reaksi dan divortex lalu diinkubasi hingga 15 menit pada suhu 37°C dalam *waterbath*. Campuran larutan tersebut dididihkan dengan *hot plate* selama 1 menit lalu didinginkan dengan air mengalir sampai suhu kamar. 150  $\mu$ l DNS ditambahkan untuk menentukan total gula reduksi yang dihasilkan, kemudian divortex dan dididihkan selama 15 menit, lalu didinginkan hingga suhu kamar. Masing-masing campuran larutan ditambahkan 1350  $\mu$ l akuades dan divortex sampai homogen, lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Absorbansi campuran larutan diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer. Blanko dibuat tanpa ditambahkan larutan enzim. Tiga kali replikasi dilakukan pada semua pengujian. Sistem reaksi pengujian aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Sistem reaksi pengujian enzim  $\alpha$ -amilase

Larutan	Volume ( $\mu$ l)					
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	C <sub>0</sub> <sup>-</sup>	C <sub>1</sub> <sup>-</sup>	C <sub>0</sub> <sup>+</sup>	C <sub>1</sub> <sup>+</sup>
Sampel	60	60	-	-	-	-
Akarbose	-	-	-	-	60	60
Enzim	90	-	90	-	90	-
Dapar fosfat pH 6,8	-	90	60	150	-	90
Vortex, kemudian diinkubasi 37°C, 15 menit						
Substrat	150	150	150	150	150	150
Vortex, kemudian diinkubasi 37°C, 15 menit						
Didihkan 1 menit dan didinginkan dengan air mengalir						
DNS	150	150	150	150	150	150
Vortex, lalu dididihkan 15 menit, dan didinginkan dengan air mengalir						
Akuades	1350	1350	1350	1350	1350	1350
Vortex, ke udian absorbansi pada panjang gelombang 540 nm						

S<sub>0</sub>= Sampel (ekstrak) , S<sub>1</sub>=Blanko sampel (ekstrak), C<sub>0</sub><sup>-</sup>= Kontrol negatif, C<sub>1</sub><sup>-</sup>=

Blanko kontrol negatif, C<sub>0</sub><sup>+</sup>= Kontrol positif (akarbose), C<sub>1</sub><sup>+</sup>= Blanko kontrol positif (Sya'bani, 2016)

Nilai penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase pada ekstrak atau sampel dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Nugraha dan Hasanah, 2018):

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{\text{Abs 540 (kontrol)} - \text{Abs 540 (ekstrak)}}{\text{Abs 540(kontrol)}} \times 100$$

Persamaan regresi linier dibuat dengan sumbu x sebagai konsentrasi dan sumbu y sebagai % penghambatan, digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>. Untuk menentukan IC<sub>50</sub> dari persamaan regresi linier  $y=bx+a$  yang diperoleh, digunakan persamaan 3.1:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50-a}{b}$$

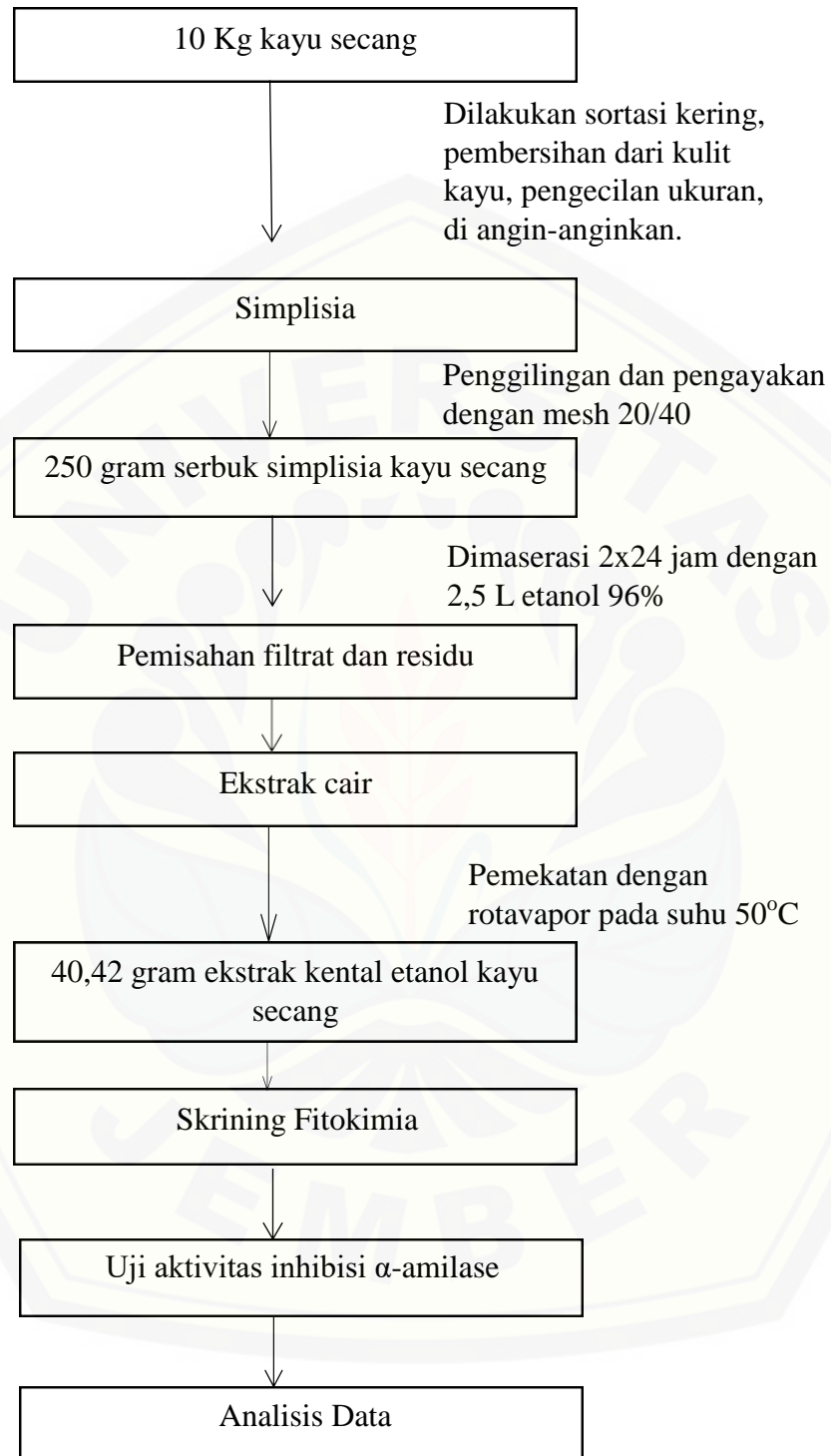
### 3.6.6 Analisis Data

Data IC<sub>50</sub> dari akarbose dan ekstrak kayu secang yang diperoleh dari hasil penelitian akan diolah, diuji normalitas (Shapiro-Wilk) sebagai syarat uji T. Data

IC<sub>50</sub> dianalisis menggunakan uji T tidak berpasangan untuk melihat perbedaan IC<sub>50</sub> antara akarbose dan ekstrak kayu secang (Dahlan, 2004).



## 3.6.7 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak kayu secang mengandung senyawa alkaloid, triterpen steroid, steroid, flavonoid, tanin, polifenol dan antakinon.
2. Ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 763,174  $\mu\text{g/ml}$ .
3. Ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase yang lebih lemah dibandingkan kontrol positif (akarbose) dengan nilai  $IC_{50}$  43,510 $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian uji aktivitas antidiabetes dari kayu secang dengan mekanisme lain.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak kayu secang dengan menggunakan jenis pelarut, metode ekstraksi, dan metode pengujian yang berbeda untuk pembandingan.



## DAFTAR PUSTAKA

- AACE/ACE (American Association of Clinical Endocrinologist and American College of Endocrinology). 2019. Aace/ace comprehensive type 2 diabetes management algorithm. *Diabetes Comprehensive Care*. 25(1):69–100.
- ADA (American Diabetes Assosiation). 2019. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 42(1):1–159.
- Ademiluyi, A. O. dan G. Oboh. 2013. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and hypertension (angiotensin i converting enzyme) in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65(3):305–309.
- Anh, L. H., T. D. Xuan, N. T. D. Thuy, N. V. Quan, dan L. T. Trang. Antioxidant and  $\alpha$ -amylase Inhibitory Activities and Phytochemicals of *Clausena indica* Fruits. *Medicines*. 7(10):1-11.
- Arsiningtyas, I. S. 2015. Search for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from Indonesian Indigenous Plants. Universitas Hokkaido.
- Arvindekar, Aditya, T. More, P. V. Payghan, K. Laddha, N. Ghoshal, dan Akalpita Arvindekar. 2015. Evaluation of anti-diabetic and alpha glucosidase inhibitory action of anthraquinones from rheum emodi. *Food and Function*. 6(8):2693–2700.
- Asif, H. M., M. Akram, T. Saeed, M. I. Khan, N. Akhtar, R. U. Rehman, S. M. A. Shah, K. Ahmed, dan G. Shaheen. 2011. Carbohydrates. *Journal of Biochemistry and Bioinformatics*. 1(1):1–5.
- Baynest, H. W. 2015. Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 6(5):1–9.
- Bhutkar, M. A. dan S. B. Bhise. 2012. In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *International Journal of Chemical Sciences*. 10(1):457–462.
- Blanco, A. dan G. Blanco. 2017. *Enzymes Are Biological Catalysts*. Elsevier Inc. *Medical Biochemistry*.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(1):190–200.
- Chigurupati, S., S. S. Nanda, D. K. Yi, K. K. Selvarajan, S. A. Shaikh, J. I. Mohammad, dan A. R. Nemala. 2019. Inhibitory activities of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase and their hypoglycaemic capability in the treatment of diabetes. *EC Pharmacology and Toxicology*. 2(1):79–91.
- Dahlan. 2004. *Statistika Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Uji Hipotesis Dengan*

- Menggunakan SPSS Seri 1: Evidence Based Medicine*. Jakarta: Arkans Entertainment and Education in Harmony.
- Dashty, M. 2013. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*. 46(15):1339–1352.
- Decroli, E. 2019. *Diabetes Mellitus Tipe 2*. Edisi 1. Padang: Pusat Penerbitan Bagian Ilmu Penyakit Dalam.
- Deng, D. dan N. Yan. 2016. Glut, sgl, and sweet: structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Science*. 25(3):546–558.
- Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Edisi 6. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dinicolantonio, J. J., J. Bhutani, dan J. H. O’Keefe. 2015. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart*. 2(1):1–9.
- Dipiro, J. T., R. L. Tolbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells, dan L. M. Posey. 2015. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. Edisi 9. Washington, D.C.: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Forbes, J. M. dan M. E. Cooper. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*. 93(1):137–188.
- Fu, L. C., X. A. Huang, Z. Y. Lai, Y. J. Hu, H. J. Liu, dan X. L. Cai. 2008. A new 3-benzylchroman derivative from sappan lignum (*caesalpinia sappan*). *Molecules*. 13(8):1923–1930.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of methoxyl group. *The Journal of Biochemistry*. 77(8):934–935.
- Ganesan, K. dan S. Sultan. 2019. *Oral Hypoglycemic Medications*. Edisi 1. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Garriga, M., M. Almaraz, dan A. Marchiaro. 2017. Determination of reducing sugars in extracts of *undaria pinnatifida* (harvey) algae by uv-visible spectrophotometry (dns method). *Actas de Ingeniería*. 3(1):173–179.
- Gonçalves, S. dan A. Romano. 2017. Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. 40(5):100–120.
- Gourgari, E., E. E. Wilhelm, H. Hassanzadeh, V. R. Aroda, dan I. Shoulson. 2017. A comprehensive review of the fda-approved labels of diabetes drugs: indications, safety, and emerging cardiovascular safety data. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 31(12):1719–1727.
- Hanh, T. T. H., N. H. Dang, dan N. T. Dat. 2016.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory saponins from *polyscias fruticosa* leaves. *Journal of Chemistry*. 2016:3–8.

- Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Edisi 2. New York: Chapman and Hall Ltd. 9. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Hossain, S., M. El-Sayed, dan H. Aoshima. 2009. Antioxidative and anti- $\alpha$ -amylase activities of four wild plants consumed by pastoral nomads in egypt. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 9(3):217–224.
- Huda, N. 2019. Pengaruh Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Dan Gambaran Histopatologi Pankreas Tikus Diabetes. Universitas Jember.
- IDF (International Diabetes Federation). 2017. *Idf Diabetes Atlas*. Edisi 8. International Diabetes Federation.
- ITIS. 2019. *Caesalpinia Sappan*. [https://www.itis.gov/servlet/SingletRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=506349&print\\_version=PRT&source=to\\_print#null](https://www.itis.gov/servlet/SingletRpt?search_topic=TSN&search_value=506349&print_version=PRT&source=to_print#null) [Diakses pada June 4, 2019].
- Jelenković, L., V. S. Jovanović, I. Palić, V. Mitić, dan M. Radulović. 2014. In vitro screening of  $\alpha$ -amylase inhibition by selected terpenes from essential oils. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(9):1421–1428.
- Jiang, P., J. Xiong, F. Wang, M. H. Grace, M. A. Lila, dan R. Xu. 2017. A-amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of phenolic.pdf. *Journal of Chemistry*. 2017(1):1–8.
- Jong-Anurakkun, N., M. R. Bhandari, dan J. Kawabata. 2007. A-glucosidase inhibitors from devil tree (*alstonia scholaris*). *Food Chemistry*. 103(4):1319–1323.
- Jung, E. G., K. Il Han, S. G. Hwang, H. J. Kwon, B. B. Patnaik, Y. H. Kim, dan M. D. Han. 2015. Brazilin isolated from *caesalpinia sappan* l. inhibits rheumatoid arthritis activity in a type-ii collagen induced arthritis mouse model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(1):1–11.
- Kalra, S. 2014. Alpha-glucosidase inhibitor. *Journal of Pakistan Medical Association*. 64(4):474–478.
- Kato, C. G., G. De Almeida Gonçalves, R. A. Peralta, F. A. V. Seixas, A. B. De Sá-Nakanishi, L. Bracht, J. F. Comar, A. Bracht, dan R. M. Peralta. 2017. Inhibition of  $\alpha$ -amylases by condensed and hydrolysable tannins: focus on kinetics and hypoglycemic actions. *Enzyme Research*. 2017
- KemenKes RI. 2018. *Hasil Utama Riskesdas 2018*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemit, N., I. W. R. Widarta, dan K. Nocianitri. 2017. Pengaruh jenis pelarut dan waktu maserasi terhadap kandungan senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun alpukat (*persea americana* mill). *Jurnal Ilmu Dan*

*Teknologi Pangan (Itepa)*. 5(2):130–141.

- Koda-Kimble, M. A., L. Young, B. K. Alldrege, R. L. Corelli, B. J. Guglielmo, W. A. Kradjan, dan B. R. Williams. 2013. *Applied Therapeutics*. Edisi 9. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lee, M. J., H. S. Lee, H. J. Jung, C. S. Lee, J. E. Kim, H. I. Moon, dan W. H. Park. 2010. Caesalpinia sappan l. ameliorates hypercholesterolemia in c57bl/6 mice and suppresses inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells (huvecs) by antioxidant mechanism. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 32(4):671–679.
- Li, K., F. Yao, Q. Xue, H. Fan, L. Yang, X. Li, L. Sun, dan Y. Liu. 2018. Inhibitory Effects against  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase of the Flavonoids-Rich Extract from Scutellaria Baicalensis Shoots and Interpretation of Structure–activity Relationship of Its Eight Flavonoids by a Refined Assign-Score Method
- Majgaine, S. dan D. L. Verma. 2017. Phytochemical screening of main classes of secondary metabolites from boerhaavia diffusa growing in three major district of kumaun himalaya. *Journal of Pharmacy*. 7(8):24–29.
- Manaf, A. 2010. *Use of Acarbose to Control Postprandial Hyperglycemia in Reducing Macrovascular Complication*. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Marcovecchio, M. L., M. Lucantoni, dan F. Chiarelli. 2011. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. *Diabetes Technology and Therapeutics*. 13(3):389–394.
- Mariappan, N., S. Krishnakumar, S. R. Kumar, dan K. K. Surendar. 2014. Caesalpinia sappan l.: comprehensive review on seed source variation and storability. *Plant Gene and Trait*. 5(2):11–21.
- Mendoza, N. dan E. M. E. Silva. 2018. *Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance*. INTECH Open Access Publisher. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*.
- Mera, I. F. G., D. E. G. Falconi, dan V. M. Cordova. 2019. Secondary metabolites in plants: main classes , phytochemical analysis and pharmacological activities . *Journal of Biotechnology and Life Sciences*. 4(4):1–7.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426–428.
- Mohan, C. 2014. *A Guide For The Preparation and Use of Buffers in Biological System*. Berlin: Merck. August 2006.
- Moini, J. 2019. Pathophysiology of diabetes. *Epidemiology of Diabetes*. 30(1):25–43.

- Muhammadiyah, N. S. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) Terhadap Kadar Kolesterol Total Dan Trigliserida Darah Tikus Diabetes Yang Diinduksi Aloksan. Universitas Jember.
- Murray, R. K., D. A. Bender, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, I, dan P. A. Weil. 2017. *Biokimia Harper*. Edisi 29. Jakarta: EGC.
- Neubig, R. R., M. Spedding, T. Kenakin, dan A. Christopoulos. 2003. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 55(4):597–606.
- Nirmal, N. P., M. S. Rajput, R. G. S. V. Prasad, dan M. Ahmad. 2015. Brazilin from *caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8(6):421–430.
- Nugraha, M. R. dan A. N. Hasanah. 2018. Metode pengujian aktivitas antidiabetes. *Farmaka*. 16(3):28–33.
- Pamela, D. S., H. P. Pahlemy, A. Fitriansyah, S. Suratini, B. D. Jerubu, dan C. R. Khristanti. 2019. *Pedoman Pelayanan Kefarmasian*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Pavarini, D. P., S. P. Pavarini, M. Niehues, dan N. P. Lopes. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. 176(1–4):5–16.
- Proenca, C., M. Freitas, D. Ribeiro, S. M. Tomé, E. F. T. Oliveira, M. F. Viegas, A. N. Araújo, M. J. Ramos, A. M. S. Silva, P. A. Fernandes, dan E. Fernandes. 2019. Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase towards a structure–activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34(1):577–588.
- Puttipan, R., S. Chansakaow, S. Khongkhunthian, dan S. Okonogi. 2018. *Caesalpinia sappan*: a promising natural source of antimicrobial agent for inhibition of cariogenic bacteria. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 12(4):197–205.
- Ramakrishna, A. dan G. A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6(11):1720–1731.
- Rani, K., R. Rana, dan S. Datt. 2015. Review on characteristics and application of amylases. *International Journal of Microbiology and Bioinformatics*. 1(February):1–5.
- Rosak, C. dan G. Mertes. 2012. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 5(1):357–367.
- Sa'pang, M. 2015. Efek Antihiperlipemik Minuman Secang (*Caesalpinia Sappan* Linn.) Pada Wanita Dewasa Dengan Pradiabetes. Institut Pertanian Bogor.

- Saefudin, G. Pasaribu, S. Sofnie, dan E. Basri. 2014. Effect of sappan wood (*caesalpinia sappan* l) extract on blood glucose level in white rats. *Indonesian Journal of Forestry Research*. 1(2):109–115.
- Saini, R., H. S. Saini, dan A. Dahiya. 2017. Amylases: characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(4):1865–1871.
- Sales, P. M., P. M. Souza, L. A. Simeoni, P. de O. Magalhães, dan D. Silveira. 2012. A-amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 15(1):141–183.
- Sari, R. dan Suhartati. 2016. Secang (*caesalpinia sappan* l.): tumbuhan herbal kaya antioksidan. *Info Teknis EBONI*. 13(1):57–68.
- Sharma, R. 2016. Enzyme inhibition: mechanisms and scope. *Enzym Inhibition and Bioapplications*. 4(1):13.
- Soelistijo, S. A., H. Novida, A. Rudijanto, P. Soewondo, K. Suastika, A. Manaf, dan H. Sanusi. 2015. *Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Mellitus Tipe 2 Di Indonesia*. Edisi 1. Jakarta: PB perkeni.
- Souza, P. M. de dan P. de O. e Magalhães. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(4):850–861.
- Simanjuntak, L. 2019. Efektivitas Ekstraksi Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol dan Rasio Bahan. Universitas Katolik Soegijapranata.
- Suharti, K., Suherman, dan Nafrialdi. 2016. *Farmakologi Dan Terapi*. Edisi 6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Sya'bani, A. A. K. 2016. Uji Aktivitas Inhibitor  $\alpha$ -Amilase Ekstrak Teh Hitam Dan Teh Hijau Sebagai Agen Antidiabetes. Universitas Jember.
- Takahama, U. dan S. Hirota. 2018. Interactions of flavonoids with  $\alpha$ -amylase and starch slowing down its digestion. *Food and Function*. 9(2):677–687.
- Tao, L. Y., J. Y. Li, dan J. Y. Zhang. 2013. Brazilein, a compound isolated from *caesalpinia sappan* linn., induced growth inhibition in breast cancer cells via involvement of gsk-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin/cyclin d1 pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 206(1):1–5.
- Tarakanita, D. N. S., T. Satriadi, dan A. Jauhari. Potensi keberadaan fitokimia kamalaka (*Phyllanthus emblica*) berdasarkan perbedaan ketinggian tempat tumbuh. *Jurnal Sylva Scientiae*. 2(4):645-653.
- Timerman, A. P. 2012. *The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies*. USA: INTECH Open Access Publisher. *Protein Purification*.

- Tintu, I., K. V. Dileep, A. Augustine, dan C. Sadasivan. 2012. An isoquinoline alkaloid, berberine, can inhibit fungal alpha amylase: enzyme kinetic and molecular modeling studies. *Chemical Biology and Drug Design*. 80(4):554–560.
- Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, dan K. H. 2011. Phytochemical screening and extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1):98–105.
- Tripathi, K. dan B. Saboo. 2019. *Sadikot's International Textbook of Diabetes*. Edisi 1. New Delhi: Jaypee Brother Medical Publisher (P) Ltd.
- Wahyudi, N. S. 2015. Potensi Ekstrak Fenolik Tanaman Obat Taman Nasional Meru Betiri: Bidara Upas (*Merremia Mammosa*) Dan Kayu Kuning (*Arcangelisia Flava*) Sebagai Antidiabetik Dan Antioksidan. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- WHO. 2019. Classification of diabetes mellitus. *The Lancet*. 309(8023):1202–1203.
- Widowati, W. 2011. Uji fitokimia dan potensi antioksidan ekstrak etanol kayu secang (*caesalpinia sappan l.*). *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 11(1):23–31.
- Widyawati, R. 2014. Identifikasi Kemampuan Ekstrak Kumis Kucing Dari Berbagai Daerah Di Pulau Jawa Sebagai Inhibitor Aktivitas Enzim Alfa Amilase Dan Alfa Glukosidase
- Williamson, G. 2013. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition and Food Research*. 57(1):48–57.
- Xiao, Z., R. Storms, dan A. Tsang. 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*. 351(1):146–148.
- Zhang, B. wei, Y. Xing, C. Wen, X. xia Yu, W. long Sun, Z. long Xiu, dan Y. sheng Dong. 2017. Pentacyclic triterpenes as  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors: structure-activity relationships and the synergism with acarbose. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 27(22):5065–5070.

## LAMPIRAN

**Lampiran 3 Perhitungan Penyiapan Bahan****3.1 Larutan Dapar Fosfat pH 6,9**

A. Massa natrium dihidrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } M &= \frac{g}{\text{BM}} \times \frac{1000}{\text{ml}} \\ g &= \frac{M \times \text{BM} \times \text{ml}}{1000} \\ g &= \frac{0,1 \times 119,98 \times 500}{1000} = 5,9 \text{ gram dalam 500 ml aquades} \end{aligned}$$

B. Massa natrium hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,1 M

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } M &= \frac{g}{\text{BM}} \times \frac{1000}{\text{ml}} \\ g &= \frac{M \times \text{BM} \times \text{ml}}{1000} \\ g &= \frac{0,1 \times 141,96 \times 500}{1000} = 7,1 \text{ gram dalam 500 ml aquades} \end{aligned}$$

**3.2 Larutan Pati 1%**

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } \frac{1 \text{ g}}{100 \text{ ml}} &= \frac{x}{50 \text{ ml}} \\ x &= 0,5 \text{ gram dalam 50 ml dapar} \end{aligned}$$

**3.3 Larutan 96 Mm 3,5-dinitrosalisilat acid (DNS)**

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } g &= \text{Mr} \times M \times V \\ g &= 228,12 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 96 \times 10^{-3} \text{ M} \times 0,025 \text{ L} \\ &= 0,5475 \text{ gram dalam 25 ml aquades} \end{aligned}$$

**3.4 Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 2 M**

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } g &= \text{Mr} \times M \times V \\ g &= 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 2 \text{ M} \times 0,025 \text{ L} \\ g &= 2 \text{ gram dalam 25 ml akuades} \end{aligned}$$



### 3.5 Larutan Sampel Ekstrak Kayu Secang

1.  $\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (ditimbang 10 mg ekstrak, dilarutkan dalam 10 ml dapar dalam labu ukur).
2.  $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (dipipet 1 ml dari larutan sampel 1000  $\mu\text{g/ml}$ , dimasukkan dalam labu ukur 10 ml, ditambahkan dapar sampai tepat tanda).
3.  $\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2000 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (ditimbang 20 mg ekstrak, dilarutkan dalam 10 ml dapar dalam labu ukur)
3.  $\frac{500 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$
4.  $\frac{200 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$
5.  $\frac{400 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 400 \text{ } \mu\text{g/ml}$
6.  $\frac{800 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 800 \text{ } \mu\text{g/ml}$
7.  $\frac{600 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 2000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1200 \text{ } \mu\text{g/ml}$

### 3.6 Pengenceran Larutan Enzim

Rumus larutan enzim stok :

$$\frac{16 \text{ U}}{1 \text{ mg}} \times \frac{\quad}{10 \text{ ml}} = 10 \text{ U/ml}$$

X = 6,25 mg dalam 10 ml dapar (ditimbang 6,25 mg enzim kemudian dilarutkan dalam 10 ml dapar dengan labu ukur)

Pengenceran larutan enzim :

$$2 \text{ U/ml} \rightarrow \frac{2 \text{ U/ml} \times 5 \text{ ml}}{10 \text{ U/ml}} = 1 \text{ ml}$$

### 3.7 Larutan Akarbose

1.  $\frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 500 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (ditimbang 5 mg enzim kemudian dilarutkan dalam 10 ml dapar menggunakan labu ukur).
2.  $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (dipipet 1 ml larutan enzim 500  $\mu\text{g/ml}$  kemudian ditambahkan hingga 10 ml dapar dalam labu ukur).
3.  $\frac{100 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$
3.  $\frac{200 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$
4.  $\frac{1 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$

$$5. \frac{500 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 50 \mu\text{g/ml} = 25 \mu\text{g/ml}$$

$$6. \frac{100 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml}$$

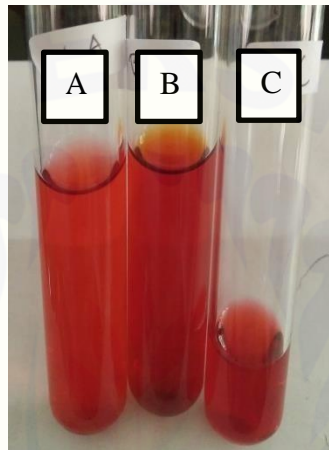


## Lampiran 4.1 Hasil determinasi tanaman kayu secang

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0
 <b>KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI</b> <b>POLITEKNIK NEGERI JEMBER</b> <b>LABORATORIUM TANAMAN</b> Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531 E-mail : <a href="mailto:Polije@polije.ac.id">Polije@polije.ac.id</a> Web Site : <a href="http://www.Polije.ac.id">http://www.Polije.ac.id</a>
<b><u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u></b> No: 65/PL17.3.1.02/LL/2018
Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 3242/UN25.13/LL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:
Nama : Iskandar Parlingdungan A.S; Nur Huda; dan Noer Sidqi Muhammadiy NIM : 152210101108; 152210101112; dan 152210101152 Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember
maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: <i>Kingdom/Regnum: Plantae; Divisio: Spermatophyta; Sub Divisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Fabales; Famili: Caesalpiniaceae; Genus: Caesalpinia; Spesies: Caesalpinia sappan, L.</i>
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.
Jember, 13 Desember 2018  Lilik Mastuti, MP NIP. 195808201987032001

**Lampiran 4.2 Bobot Rendemen Ekstrak**

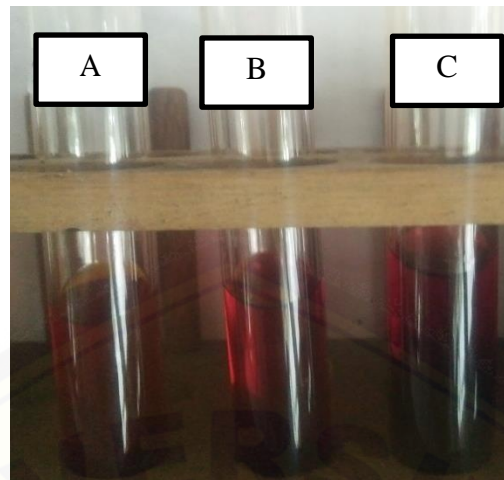
$$\begin{aligned}\text{Persen Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi}} \times 100\% \\ &= \frac{40,42 \text{ gram}}{250 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 16,16 \% \text{ b/b}\end{aligned}$$

**Lampiran 4.3 Hasil Skrining Fitokimia**

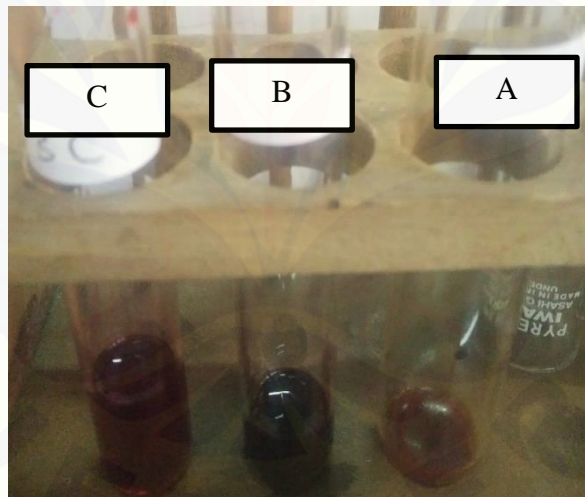
Hasil skrining fitokimia golongan senyawa alkaloid, (a) sampel yang ditambah pereaksi Mayer, (b) sampel yang ditambah pereaksi Wagner, dan (c) blanko. Pada penambahan pereaksi Wagner terjadi endapan menunjukkan adanya alkaloid.



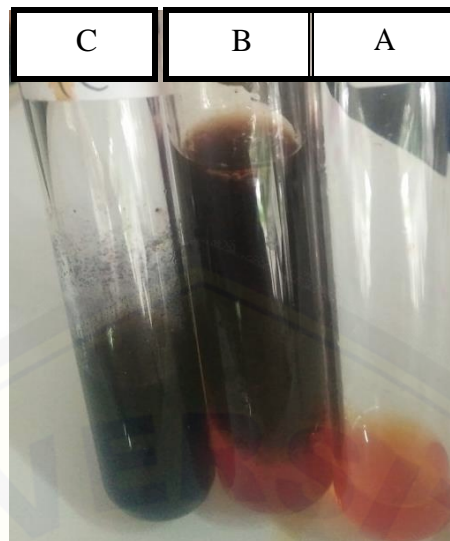
Pada uji buih tidak terbentuk buih menunjukkan tidak mengandung saponin.



Hasil skrining fitokimia golongan saponin, triterpenoid, dan steroid, (a) blanko, (b) hasil uji Lierbermann-Burchard terjadi warna merah ungu menunjukkan adanya triterpen steroid, (c) hasil uji Salkowski terjadi cincin berwarna merah menunjukkan adanya steroid tak jenuh.



Hasil skrining fitokimia golongan flavonoid, (a) blanko, (b) uji Bate-Smith dan Metclaf terjadi warna ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin, dan (c) uji Wilstater terjadi warna merah tua menunjukkan adanya flavonon.



Hasil skrining fitokimia golongan polifenol dan tanin, (a) blanko, (b) uji ferriklorida terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin, dan (c) uji gelatin tidak timbul endapan namun setelah ditambah  $\text{FeCl}_3$  terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya polifenol.



Hasil skrining fitokimia golongan senyawa antrakinon dengan uji Borntrager, (a) blanko dan (b) sampel yang ditambah ammonia terjadi warna merah menunjukkan adanya antrakinon.



Hasil skrining fitokimia golongan senyawa antrakinon dengan uji Modifikasi Borntrager, (a) blanko dan (b) sampel yang ditambah ammonia terjadi warna merah menunjukkan adanya antrakinon.

## Lampiran 4.4 Hasil Uji Aktivitas

### 4.4.1 Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Enzim $\alpha$ -Amilase

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

$$\text{IC}_{50} = \frac{50-a}{b}$$

#### a. Akarbose

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			% Inhibisi			Rata-rata		IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	% Inhibisi	SD	R1	R2	R3
C <sup>-</sup>	0,930	0,935	0,933								
5	0,733	0,735	0,730	21,436	21,222	21,758	21,472	0,003	43,537	43,719	43,273
10	0,685	0,683	0,683	26,581	26,795	26,795	26,724	0,001			
25	0,507	0,509	0,501	45,659	45,445	46,302	45,802	0,005	Rata-rata IC <sub>50</sub>		
50	0,359	0,362	0,357	61,522	61,200	61,736	61,486	0,003	µg/ml	SD	CV
100	0,201	0,201	0,205	78,457	78,457	78,028	78,314	0,003	43,510	0,224	0,005

Keterangan : C<sup>-</sup>=kontrol negatif



## b. Ekstrak kayu secang

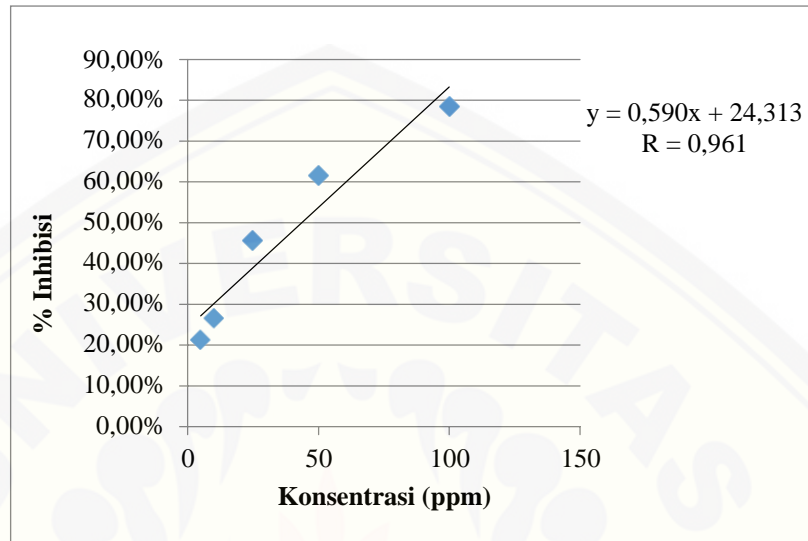
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			% Inhibisi			Rata-rata		IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	% Inhibisi	SD	R1	R2	R3
C <sup>-</sup>	0,930	0,935	0,933								
50	0,713	0,710	0,715	23,579	23,901	23,365	23,615	0,003	778,8	765,367	745,355
100	0,657	0,653	0,650	29,582	30,011	30,332	29,975	0,004			
200	0,616	0,610	0,613	33,976	34,620	34,298	34,298	0,003			
400	0,536	0,525	0,523	42,551	43,730	43,944	43,408	0,008	Rata-rata IC <sub>50</sub>		
800	0,453	0,450	0,448	51,447	51,768	51,983	51,733	0,003	µg/ml	SD	CV
1200	0,375	0,360	0,359	59,807	61,415	61,522	60,915	0,010	763,174	16,830	0,022

Keterangan : C<sup>-</sup>=kontrol negatif

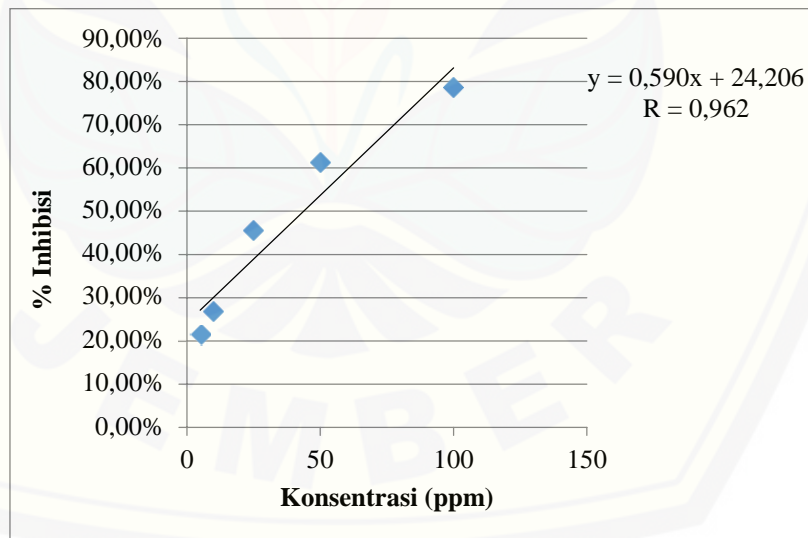
#### 4.1.2 Kurva Konsentrasi Sampel Vs % Inhibisi

##### a. Akarbose

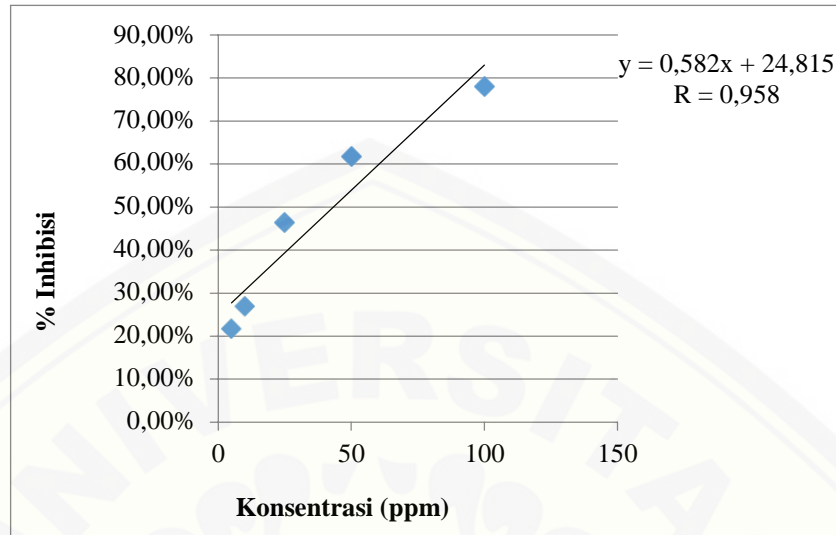
- Replikasi 1



- Replikasi 2

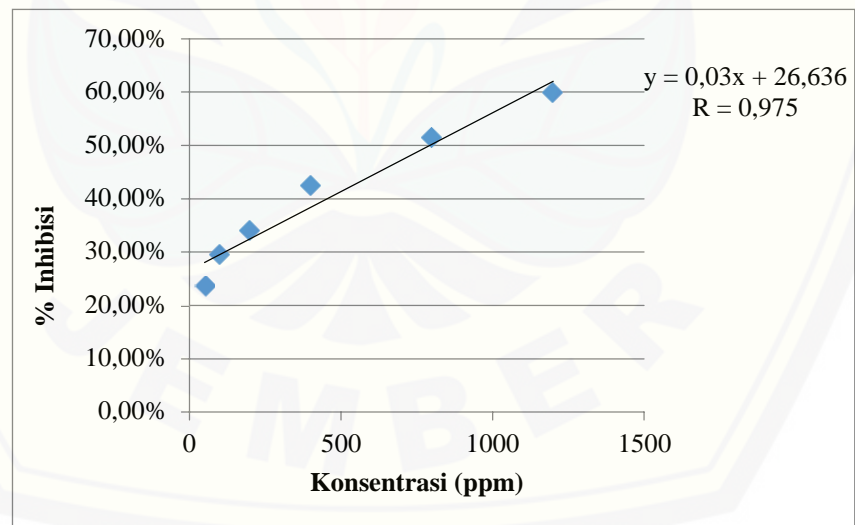


- Replikasi 3

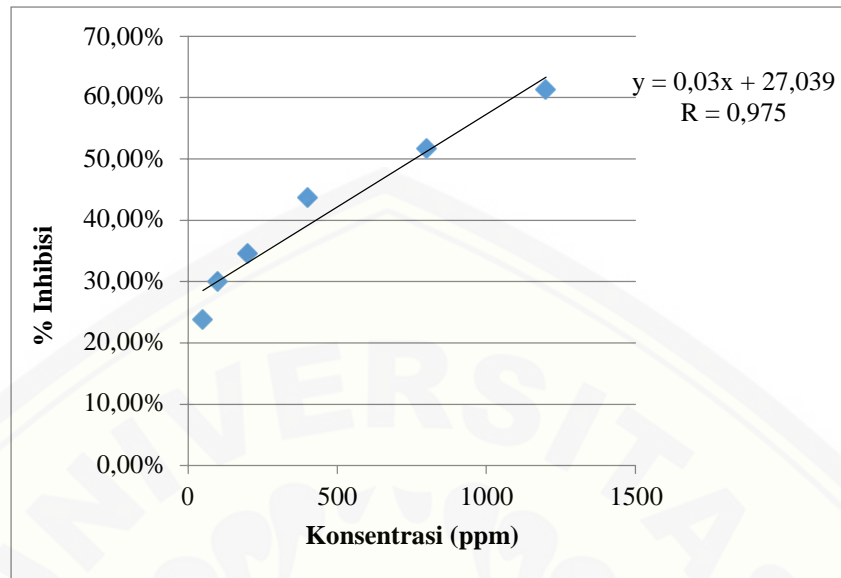


b.K ayu secang

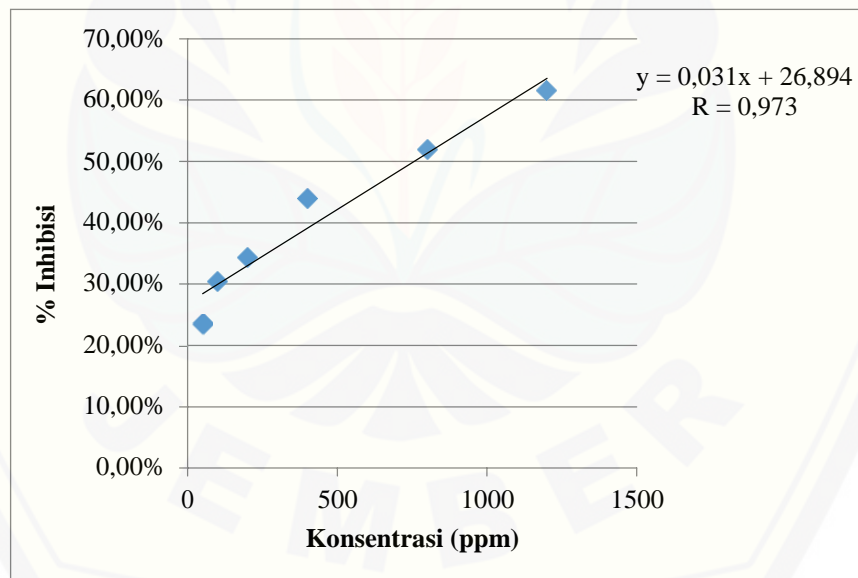
- Replikasi 1



- Replikasi 2



- Replikasi 3



**Lampiran 4.5 Data Analisis Statistik T-Test****4.5.1 Tes Normalitas****Tests of Normality**

Sampel		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50	Akarbosa	.215	3	.	.989	3	.798
	Secang	.219	3	.	.987	3	.784

a. Lilliefors Significance Correction

#### 4.5.2 Hasil analisis T-test

##### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
IC50	Equal variances assumed	5.758	.074	-74.057	4
	Equal variances not assumed			-74.057	2.001

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
					Lower
IC50	Equal variances assumed	.000	-719.664333	9.717668	-746.644906
	Equal variances not assumed	.000	-719.664333	9.717668	-761.461866

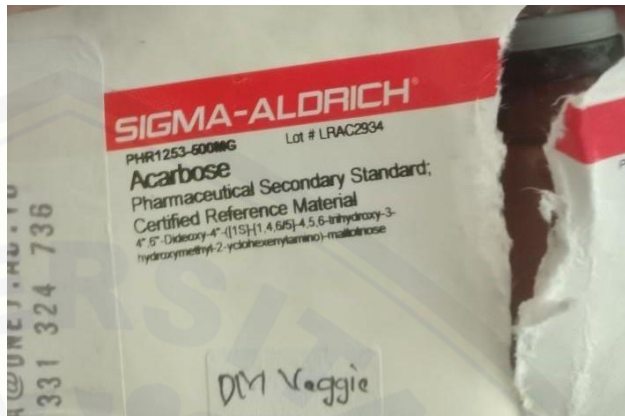
**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Upper	
IC50	Equal variances assumed	-692.683761	
	Equal variances not assumed	-677.866801	

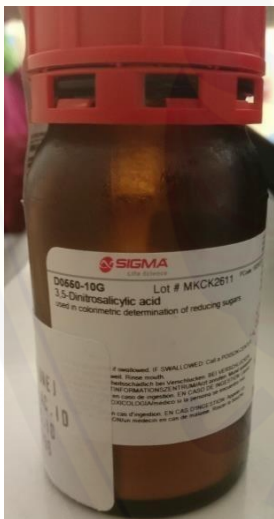
Lampiran 4.6 Dokumentasi penelitian



Ekstrak kayu secang



Akarbose



Reagen DNS



Sampel





Proses *sentrifuge*



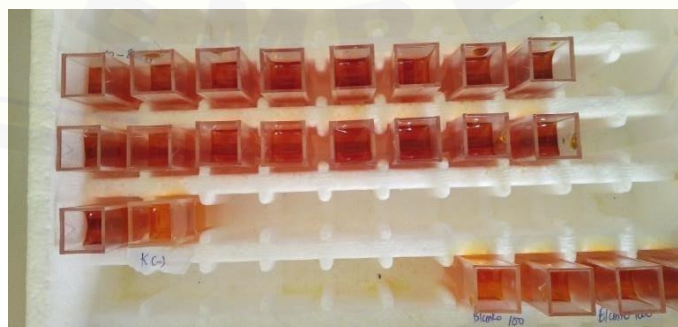
Proses inkubasi



Penambahan DNS



Proses pemanasan



Sampel dalam kuvet